



DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES ET NUTRITION

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION

Unité de formation doctorale des sciences alimentaires et nutrition

**Mise au point d'outils moléculaires pour l'identification des flores
fongiques ochratoxinogènes : Application à la traçabilité du café
Camerounais**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT/Ph.D.**

Sciences Alimentaires et Nutrition/Microbiologie et sécurité alimentaire

Par

NGANOU DONKENG Nadège

DEA en Sciences Alimentaires et Nutrition/Microbiologie

Matricule : 04D093EN

Jury :

ETOA F.X.	Professeur	Université de Yaoundé I	Président
ESSIA NGANG J.J.	Maître de Conférences	Université de Yaoundé I	Rapporteur
NDJOUENKEU R.	Professeur	Université de Ngaoundéré	Rapporteur
SCHER J.	Professeur	Université de Lorraine	Examineur
MBOFUNG C.M.F.	Professeur	Université de Ngaoundéré	Directeur
MONTET D.	Directeur de Recherches	CIRAD de Montpellier	Co-Directeur
TATSADJIEU NGOUNE L.	Maître de Conférences	Université de Ngaoundéré	Co-Directeur
HOOPEN TEN G.M	Chercheur	CIRAD de Yaoundé	Invité

Année 2012

FICHE DE CERTIFICATION

Nous attestons que la présente thèse a été menée au Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI) de l'Université de Ngaoundéré ainsi que dans les laboratoires de Microbiologie, de Chimie et de Biologie Moléculaire du Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Montpellier, par Mme NGANOU DONKENG Nadège en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Sciences Alimentaires et Nutrition (Spécialité : Microbiologie et Sécurité Alimentaire).

UNITE DE FORMATION DOCTORALE

Sciences Alimentaires / Nutrition

MBOFUNG Carl Moses

MONTET Didier

TATSADJIEU NGOUNE Léopold

PAGE DES SIGNATURES

Nous acceptons que la thèse intitulée : Utilisation d'outils moléculaire pour la caractérisation des flores complexes fongiques à différents stades des procédés de transformation du café Camerounais, soit soutenue publiquement par Mme NGANOU DONKENG Nadège à l'Ecole Nationale des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI) pour l'obtention du grade de Docteur/Ph.D en Sciences Alimentaires et Nutrition (SAN), (Spécialité : Microbiologie et Sécurité Alimentaire) de l'Université de Ngaoundéré.

Le Responsable de la formation Doctorale :

Le Chef de Département SAN :

Le Directeur de l'ENSAI :

DEDICACES

A l'Eternel Dieu tout puissant pour toutes ses grâces en ma modeste personne.

A mes parents : M et Mme NGANOU

A mes parents sous tutelle : M et Mme SOKENG

A ma fille : KAGHO NGANOU Naomie Ornelle

A mon époux : KOM Blaise

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-Industrielles (ENSAI) ainsi que dans les laboratoires de Microbiologie, Chimie et de Biologie Moléculaire du Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude à **l'Eternel Dieu tout puissant** pour toutes ses grâces en ma modeste personne.

Je remercie le **Pr. MBOFUNG Carl Moses**, le Superviseur de ce travail de recherche, qui malgré les charges administratives et académiques, n'a ménagé aucun effort pour la supervision de ce travail, et grâce à qui j'ai toujours eu des conseils me permettant d'aller de l'avant.

J'exprime ma profonde reconnaissance au **Pr. TATSADJIEU NGOUNE Léopold** pour tout son apprentissage et toute l'éducation reçus jusqu'ici, et aussi pour l'encadrement qu'il ne cesse de donner à la jeunesse au Cameroun; une pensée à l'équipe de Microbiologie Alimentaire de l'ENSAI.

Je remercie le **Service de Coopération et d'Action Culturelle(SCAC)** de l'Ambassade de France au Cameroun pour l'octroi d'une bourse de 10 mois en alternance d'un séjour au CIRAD dans le cadre de ma thèse de Doctorat Ph.D; merci à Mesdames **Annick MALLET et Béatrice BEAUDOUIN**.

J'exprime ma profonde reconnaissance au **Dr Didier MONTET** pour son Accueil, et son Encadrement dans le cadre de ce financement et aussi pour sa grande affection. Didier tu as été non seulement un encadreur mais aussi un Papa pour moi durant cette période, MERCI.

Je remercie l'ex Directeur du CIRAD, Monsieur **Max REYNES** pour avoir accepté ma présence, ainsi que tout le personnel du CIRAD avec qui j'ai partagé 10 mois de stage; en particulier **Noel DURAND, Jean Christophe Meile, Isabelle MATAYER, Jean-Claude MANEZ, Catherine BRABET, Dominique GUEULE, Angélique Fontana-Tachon, ...**pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Mes remerciements aussi à tous les membres de l'équipe Sûreté des aliments (**Qualisud**) du CIRAD.

J'adresse un grand merci à tous les **enseignants** de l'unité de formation Doctorale des Départements de **Sciences Alimentaires et Nutrition** et de **Chimie Appliquée** de l'ENSAI, qui n'ont ménagé aucun effort en participant aux différents séminaires de suivi du déroulement des travaux de cette thèse. Leurs remarques et leurs conseils ont été déterminants aussi bien pour l'orientation que pour la finalisation de ce travail.

J'exprime également mes remerciements au **Pr. TCHIEGANG Clergé, Pr. NJINTANG YANOU Nicolas** et au **Dr. EDIMA Hélène Carole**, pour leur soutien professionnel et moral.

J'adresse un merci particulier à mes parents **M et Mme NGANOU**, ainsi qu'à mes frères et sœurs **Astride, Edwige, Collin's, Arlette et André** qui n'ont de cesse de m'offrir leur soutien dans tous les plans de ma vie. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Merci aussi à **M et Mme Sokeng**, ainsi qu'à **Malo Rebecca, Thomas, Serges, Pierre, Silière, Didérot, Christian, Hilary, Belle-douce, rayanne, Nibir et Glory**, pour les efforts et les sacrifices faits pour que je puisse réaliser ce travail, la bonne ambiance à la maison.

Un grand merci à **M KANKEU et M KAMU Albert**, pour leur aide précieuse pendant mes descentes sur le terrain, surtout lors de la collecte des échantillons. Trouvez ici mes sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent au **Dr NGANOU Albert Collins, à TANDJA Modeste, M et Mme GUIHENEUF, TCHENDJOU Vivianne, Padoue et Cédric THAN, KENGMAKONTCHOU Georges**, pour leur soutien incontestable durant les moments difficiles que j'ai eu à traverser pendant mon séjour à Montpellier. Je vous dis un grand Merci.

Je tiens à remercier tous mes collègues du Laboratoire de Microbiologie de l'ENSAI, notamment : **Dr MAIWORE Justine, Dr YAOUBA Aoudou, BAKARI Daoudou, TCHIKOUA Roger, KOM Regonne Raïssa, MBOUCHE Marcéline**, pour leurs conseils, leur collaboration et l'esprit d'équipe qui m'auront toujours marqué.

Un merci à tous mes camarades de la formation doctorale, notamment : **Mme NDOÑO, NGUIMBOU Marcel Richard, GHOMDIM NZALI Horliane, MBOUGA Gorette, MAKHLOUF Himeda, KOM Blaise, GOUDOU Augustin, PANYOO AKDOWA Emmanuel, ATCHANA Jeanne, NGATHICK Josiane, BEKA Robert, KAPSO Giscard, DJUIKOUO KONGA Ruth Vivianne, ASSIENE Armel, HADJIA ZANGUE Henriette, BIKE MBAH Jean Baptiste, DJIBRIL Alhadji, BIYANZI Pierre**, pour l'amitié qu'ils ont su créer, la sympathie, la générosité et l'esprit d'équipe.

Je remercie toute la communauté Africaine du PONANT et d'ailleurs à Montpellier pour les moments passés ensemble en particulier **Momo** (pour son dévouement et sa gentillesse), **Clémentine** (pour ses conseils et ses encouragements), **Jules** (pour ses histoires et sa bonne humeur), **Valère** (pour son soutien et son humour), **Emmanuel** (pour sa présence durant les moments difficile), **Etienne** (pour sa taquinerie géographique), **Marlyse et Jean-Marc** (pour leur humour), Christelle (pour les informations concernant le pays), **Hugues, Eugène, Virginie, ...**

Je remercie ma Famille et tous ceux que je n'ai pu citer ici, aussi nombreux qu'ils sont.

RESUME

Les graves risques que l'ochratoxine A (OTA) engendre sur la santé des consommateurs, ont conduit les instances sanitaires de l'Union Européenne à établir des normes qui définissent les limites maximales tolérables dans plusieurs denrées agricoles et dans le café en particulier. Avec le nouveau règlement européen 178/2002 imposant la détermination d'origine géographique dans le processus de traçabilité des produits alimentaires au cours des transactions commerciales, les normes se durcissent. Dans la pratique, il est difficile de déterminer avec exactitude l'origine géographique des produits alimentaires. Le présent travail a eu pour objectif de déterminer les teneurs en OTA du café par dosage chromatographique, d'identifier et de mettre en œuvre une méthode utilisant la PCR-DGGE pour analyser la totalité des flores fongiques présentes sur les échantillons de café et de déterminer l'origine géographique de ce dernier. 104 échantillons de café ont été collectés dans la région de l'Ouest (Bafoussam, Dschang, Bafang et Santchou) et dans la plaine côtière (Melong) du Cameroun durant deux campagnes caféières: 2009 et 2010. Deux traitements ont été évalués (voie sèche et voie humide) à trois étapes différentes du procédé de transformation (café en parche, en coque et café vert). La caractérisation du profil fongique des échantillons de café, s'est faite par les techniques microbiologiques classiques et par PCR-séquençage, les niveaux d'OTA ont été évalués par HPLC après extraction et filtration dans une colonne d'immunoaffinité. Les résultats obtenus ont indiqué un pourcentage de contamination fongique totale compris entre 60-92% en 2009 et 70-90% en 2010; la mycoflore toxigène associée aux grains de café contaminés par l'OTA est constituée majoritairement d'*A. carbonarius* et d'*A. niger*. Le stade de prélèvement a eu une influence significative sur la teneur en OTA du café, et le site n'a eu aucune influence sur celle-ci. Exception faite des échantillons de cafés issus du traitement par voie humide du début de la campagne caféière 2009 (124,1 µg/Kg et 46,81 µg/Kg), les analyses réalisées sur les échantillons de café montrent que de façon globale, les grains de café provenant des deux campagnes caféières ont des faibles teneurs en OTA (0,1 - 5,11 µg/Kg). Dans la présente étude, la technique moléculaire employant l'ADNr 28S en PCR-DGGE a été utilisée afin de détecter la variation des structures de la communauté fongique du café des cinq localités soumises à cette étude. Cette technique a permis de mettre en évidence un plus grand nombre d'espèces fongiques comparé à la méthode culturale classique. De plus, la PCR-DGGE a révélé que chaque site a un profil fongique qui lui est caractéristique, et malgré le fait que le type de traitement influence sur la population fongique, il y a eu des bandes communes aux échantillons de café provenant de tous les sites, ceux-ci peuvent constituer des marqueurs biologiques potentiels pour assurer la traçabilité du café de ces régions. La PCR-DGGE ayant l'avantage d'être plus rapide (24h) que l'ensemble des techniques utilisées en microbiologie classique, permet d'éviter l'analyse précise des champignons par biochimie ou en biologie moléculaire (séquençage). Elle peut donc être proposée comme un outil de traçabilité analytique rapide pour le café camerounais.

Mots clés : Café, Ochratoxine A, Mycoflore du Café, PCR-DGGE, Traçabilité, Cameroun.

ABSTRACT

Serious risks caused by ochratoxin A (OTA) on consumers health has pushed sanitary authorities of the European Union to establish standards defining the tolerable maximum limits in several agricultural food products and coffee in particular. With the new European regulation 178/2002 imposing the determination of geographical origin in view of traceability of food stuffs during commercial transactions, standards are tightened. In practice, it is difficult to determine exactly the geographical origin of foodstuffs. This work aimed to the determination of OTA contents in coffee by a chromatographic titration, to identify and implement a method using PCR-DGGE to analyze the whole mycoflora present on coffee samples and to determine the geographical origin of this later. 104 coffee samples were collected from the west region (Bafoussam, Dschang, Bafang and Santchou) and in the coastal plain (Melong) of Cameroon during two coffee seasons: 2009 and 2010. Two treatments were evaluated (dry and wet process) at three different stages of the transformation process (parchment, hulled and raw coffee). The characterization of the fungal profile of coffee samples was done using the traditional microbiological techniques and by PCR-sequencing, the levels of OTA were evaluated by HPLC after extraction and filtration in an immunoaffinity column. Results obtained indicated a percentage of total fungal contamination ranging between 60-92% in 2009 and 70-90% in 2010; the toxicogenic mycoflora associated with the coffee beans contaminated with OTA is mainly made of *A. carbonarius* and *A. Niger*. The sampling stage had a significant influence on the OTA content of coffee, but the site did not have any influence. Except coffee samples resulting from the wet process at the beginning of 2009 coffee season (124,1µg/Kg and 46,81µg/Kg), analyses carried out on coffee samples show that coffee beans coming from the two campaigns generally have low OTA contents (0,1 - 5,11µg/Kg). In the present study, the molecular technique using ADNr 28S produced by PCR-DGGE was used in order to detect the variation of fungal structures of coffee for the five localities subjected to this study. This technique made it possible to highlight a greater number of fungal species compared with the traditional farming method. Moreover PCR-DGGE revealed that each site has a characteristic fungal profile specific to it and in spite of the fact that treatment influences fungal population, there were common bands for coffee samples coming from the same site, these can constitute potential biological markers to ensure the traceability of coffee from these regions. PCR-DGGE technique has the advantage of being faster (24 hours) than all other techniques used in traditional microbiology, makes it possible to avoid specific analysis on fungi by biochemistry or in molecular biology (sequencing). It can thus be proposed as a fast analytical traceability tool for Cameroon coffee.

Key words: Coffee, Ochratoxin A, Coffee Mycoflora, PCR-DGGE, Traceability, Cameroon.

SOMMAIRE

FICHE DE CERTIFICATION	ii
PAGE DES SIGNATURES	ii
DEDICACES	iii
REMERCIEMENTS	iv
RESUME.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTES DES ABREVIATIONS	xiv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I. LE CAFE.....	6
I.1 Eléments botaniques, écologiques et répartition géographique.....	6
I.2. Structure de la graine de café.....	7
I.3. Valeur nutritive et propriétés Thérapeutiques du café boisson	10
I.4. Importance économique du café.....	11
I.5. La microflore du café.....	13
I.6. Les traitements post-récoltes	15
I.7. La boisson.....	22
II. MYCOTOXINES ET MYCOTOXINOGENESE.....	22
II. 1. Les mycotoxines.....	22
II.2. Mycotoxicogénèse.....	24
III. L'OCHRATOXINE A.....	28
III.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques	28
III.2. Toxicologie de l'OTA.....	29
III.3. L'OTA dans les aliments	31
III.4. Présence d'OTA dans le café en fonction de son origine	34
III.5. Moisissures produisant de l'OTA dans le café	34
III.6. Facteurs de développement et de toxinogénèse	35
III.7. Législation sur l'OTA	35
IV. TRAÇABILITE.....	37
IV.1. Définition.....	37
IV.2. Enjeux	38
IV.3. Intérêt de la traçabilité	39

IV.4. La traçabilité agroalimentaire	42
IV.5. La géotraçabilité	46
IV.6. Biomarqueurs.....	48
IV.7. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne.....	52
IV.8. Les acides nucléiques et les techniques de biologie moléculaire utilisées en communauté microbienne.....	54
IV.9. La méthode de PCR-DGGE.....	58
MATERIEL ET METHODES	64
I. MATERIEL	65
I.1. Le Café	66
I.2. Souches fongiques	70
II. METHODES.....	71
II.1. Echantillonnage	71
II.2. Dosage de l'OTA dans le café.....	72
III. Méthodes d'isolement et d'identification des champignons.....	75
III.1. Milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude des caractères phénotypiques	75
III.2. Isolement des moisissures.....	76
III.3. Identification des moisissures	77
IV. DETERMINATION DU PROFIL FONGIQUE PAR PCR-DGGE	84
IV.1. Extraction direct de l'ADN des moisissures présentes sur le café et amplification par PCR.....	84
IV.2. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE).....	84
RESULTATS ET DISCUSSION.....	890
I. TENEUR EN OTA DES GRAINS DE CAFE	90
I.1. Degré de contamination par l'OTA	91
I.2. Discussion.....	95
I.3. Conclusion partielle	98
II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES MOISSURES	99
II.1. Campagne caféière 2009	99
II.2. Campagne caféière 2010	104
II.3. Discussion	107
II.4. Analyses en composantes principales des deux campagnes caféières	109
II.5. Conclusion partielle.....	115

III. EVALUATION DE LA MYCOFLORE PAR PCR-DGGE	116
III.1. Vérification de la qualité de l'ADN extrait	116
III.2. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	117
III.3. Application de l'Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE) à l'analyse des moisissures.....	118
III.3. Discussion	122
III.4. Conclusion partielle	123
IV. APPLICATION DE LA PCR-DGGE A LA DETERMINATION DE L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE DU CAFE.....	124
IV. 1. Influence des sites et des traitements sur le profil DGGE	124
IV. 2. Discussion.....	127
IV. 3. Conclusion partielle	129
CONCLUSION GENERALE.....	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
ANNEXE 1	167
ANNEXE 2	172
ANNEXE 3	174
ANNEXE 4	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Espèces fongiques toxigènes contaminants les denrées alimentaires et mycotoxines associées.....	24
Tableau 2 : Exemples de teneur en OTA dans quelques produits alimentaires.....	33
Tableau 3: Normes établies sur certaines denrées alimentaires (CE 123/2005).....	36
Tableau 4 : Données environnementales des sites de collecte du café	69
Tableau 5: Souches de moisissures utilisées dans cette étude	70
Tableau 6 : Séquence des amorces pour les moisissures utilisées en PCR.....	81
Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel de PCR des moisissures	81
Tableau 8 : Composition des gels de DGGE	85
Tableau 9 : Teneur en OTA en fonction du type de traitement, du site et des souches toxigènes associées des campagnes caféières 2009 et 2010.....	93
Tableau 10: Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (aux 3 stades étudiés au cours de la campagne 2009).....	101
Tableau 11 : Comparaison des identifications des moisissures par les critères morphologiques et moléculaires.....	102
Tableau 12 : Taux de contamination des grains de café par les moisissures et les <i>Aspergillus</i> potentiellement capables de produire l'OTA (campagne 2009)	103
Tableau 13: Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (aux 3 stades étudiés au cours de la campagne 2010).....	105
Tableau 14 : Taux de contamination des grains de café par les moisissures totales et les <i>Aspergillus</i> potentiellement capables de produire l'OTA (campagne 2010)	106
Tableau 15 : Coordonnées des variables sur les quatre axes principaux.....	112
Tableau 16: Corrélation entre les différentes variables.....	112
Tableau 17: Comparaison des espèces dominantes identifiées au cours des traitements technologiques du café par les techniques culturales classique et par DDGE/séquençage...	121
Tableau 18 : Caractéristiques des échantillons utilisés pour la comparaison des profils fongiques obtenus par PCR-DGGE.....	125

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition géographique des différentes cultures de café (r : robusta, a : arabica, m : robusta et arabica) (Marc Fortier et Charveriat, 2001)	6
Figure 2 : Fleurs de caféier (<i>Coffea arabica</i>)	7
Figure 3 : Fruits de caféier (<i>Coffea arabica</i>) en cours de maturation	7
Figure 4 : Coupe d'une cerise de café. (Bytof <i>et al.</i> , 2000)	7
Figure 5 : Production mondiale de café (moyenne des années caféières de 2005/2006 à 2008/2009)	12
Figure 6 : Structure de l'Ochratoxine A (Ringot <i>et al.</i> , 2006)	28
Figure 7: Contribution des différents aliments à l'ingestion de l'OTA en Europe (<i>SCOOP Task 3.2.7, European 2002</i>).	31
Figure 8: Les objectifs de création de valeur ajoutée pour les producteurs et fabricants d'aliments (Source : GeoTraceAgri, 2005)	47
Figure 10: Représentation schématique de la méthode PCR-DGGE : (A) : comportement d'un produit de PCR lors de la DGGE, (B) : photo d'un gel DGGE après coloration au bromure d'éthidium	59
Figure 11 : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires (Ercolini, 2004) .	60
Figure 12: Localisation de la zone d'étude : plaine du Littoral et Ouest du Cameroun http://www.afrique.planete.com/cameroun/carte_cameroun.htm	67
Figure 13: Carte de l'Ouest du Cameroun représentant les sites de collecte du café (Champaud, 1972).	68
Figure 14. Étapes de traitement et de transformation du café, des cerises fraîches aux grains de café au Cameroun. I_a, I_b, II : Stades de prélèvement	72
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'une colonne d'immunoaffinité	73
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'OTA	74
Figure 17: Photo représentant l'appareil HPLC (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) utilisé pour la quantification de l'OTA	75
Figure 18 : Colonies de moisissures sur DG18 ensemencé de grains de café. (Noonim <i>et al.</i> , 2008).	77
Figure 19 : Colonies de moisissures sur PDA ensemencé de grains de café. (Noonim <i>et al.</i> , 2008).	77
Figure 20 : Conditions de réaction de la PCR pour les ADN des moisissures	82
Figure 21 : Préparation du gel de DGGE : (1) Fabrication du gradient, A: solution de haute concentration en dénaturant (70%), B: solution à faible concentration en dénaturant (40%), (2) Pompe péristaltique (3) sandwich des deux plaques de verre insérant le gel.	86
Figure 22: chromatogrammes de confirmation de la présence d'OTA dans les échantillons de café (0,1 - 31,2 µg.kg ⁻¹) avec co-injection de solution standard (A: Standard; B: 1810; C: 2910; D: 3309) (1810, 2910, 3309 représente les numéros de références du laboratoire assignés aux échantillons de café analysés).	94
Figure 23 : Photos des moisissures isolées au cours des traitements technologiques	100

Figure 24 : Cercles des corrélations des différentes variables (cont : pourcentage de contamination en moisissures totale ; %C : pourcentage de contamination en <i>A. carbonarius</i> ; %N pourcentage de contamination en <i>A. niger</i> ; %O : pourcentage de contamination en <i>A. ochraceus</i> ; HR : humidité relative)	111
Figure 25 : Distribution des échantillons de café et des variables sur les axes F1 et F2 (cont : pourcentage de contamination en moisissures totale ; %C : pourcentage de contamination en <i>A. carbonarius</i> ; %N pourcentage de contamination en <i>A. niger</i> ; %O : pourcentage de contamination en <i>A. ochraceus</i> ; HR : humidité relative ; Ib : cerises sèches ; Ia : parche sec ; II : café vert).....	114
Figure 26 : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la performance d'extraction de l'ADN des moisissures (M : marqueur, a-n : ADN des moisissures).....	116
Figure 27: Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification par PCR de l'ADN des moisissures (M: marqueur 100pb; g: témoin négatif; a – e : ADN des moisissures)	117
Figure 28 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des souches pures de moisissures isolées. M : marqueur (<i>A. niger</i>) ; 1 : <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ; 2: <i>Fusarium lacertarum</i> ; 3: <i>A. ochraceus</i> ; 4: <i>P. citrinum</i> ; 5: <i>Rhizopus sp.</i> ; 6: <i>A. oryzae</i> ; 7: <i>A. niger</i> ; 8: <i>A. niger</i>	118
Figure 29: Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des moisissures des échantillons du café à différents stades de prélèvement : (M : marqueur ; a-g : échantillons de café (3709, 3409, 3910, 1209, 1710, 2710 et 2510)). Les espèces fongiques sont indiquées par les nombres correspondant à la position des bandes. .	119
Figure 30: Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des moisissures des échantillons du café à différents stades de prélèvement : (M : marqueur ; h-n : échantillons de café (3410, 0510, 1210, 1110, 4210, 4010 et 0410)). Les espèces fongiques sont indiquées par les nombres correspondant à la position des bandes. .	120
Figure 31 : Photo du gel DGGE d'ADN des moisissures extraites des cafés des différents sites et ayant subi deux types de traitement : Voie sèche et Voie humide.	126
Figure 32: Dendogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites des cafés ayant subi deux types de traitement (voie sèche, voie humide) et prélevé dans 5 sites différents. .	127

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

AFB1: Aflatoxine B1

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANOVA : Analyse des variances

AOAC: Association of Official Analytical Chemist

APS: Persulfate d'ammonium

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARNr : Acide ribonucléique ribosomale

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ASIC : Association Scientifique Internationale du Café

BCCM: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms

BET : Bromure d'éthidium

CASH : Comité Scientifique d'Alimentation Humaine

CE : Communauté Européenne

CIRAD : Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO: Di methyl sulfoxyde

dNTP: Deoxynucléotide triphosphate

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FDA: Food and Drug Administration

GEMS/Food: Global Environment Monitoring System/Food

GTA: GeoTraceAgri

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IARC International Agency for Research on Cancer

IgA : Immuno-globuline A

IgG : Immuno-globuline G

IgM : Immuno-globuline M

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

IUPAC : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

JEFCA : Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires

Kb : Kilo paires de bases

MATAB : Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide

OGM : Oganisme génétiquement modifié

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTA : Ochratoxine A

OTB : Ochratoxine B

OTC : Ochratoxine

OT : Ochratoxine

Pb : Paires de bases

PBS : Solution saline de phosphate tamponée

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Length Fragment Polymorphism

SCF: Comité Scientifique pour les Aliments de la Commission européenne

SCOOP: Groupe de Coopération Scientifique

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SIG: Systèmes d'Information Géographique

SSCP: (Single Stranded Conformation Polymorphism)

TAE: Tris/ Ammonium/ EDTA (tampon)

TE: Tris/ EDTA (tampon)

TEMED: Tétraméthyléthylènediamine

TGGE : (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

T_m : Température de fusion

UE: Union Européenne

UNCTAD: United Nations Conference on Trade and Development

UV: Ultraviolet

INTRODUCTION GENERALE

Deuxième matière première commercialisée dans le monde, après le pétrole, le café représente 4% du commerce mondial des produits alimentaires et est une source essentielle de revenus, de devises et d'emplois pour de nombreux pays en développement. La FAO estime que la consommation mondiale de café est de 4,6 Kg/an/habitant, en Europe elle s'élève à 5,6 kg/an/habitant, en Afrique celle-ci est inférieure à 4,5 Kg/an/habitant.

Au Cameroun le café est l'un des principaux produits d'exportation, et sa destination majeure est l'Europe. La crise économique de 1987, combinée à la chute des prix dans les marchés internationaux, a causé une forte baisse de la croissance de la production de cette culture d'exportation, qui est passée de plus de 5 % (71633 tonnes de robusta, 27091 tonnes d'arabica) en moyenne annuelle entre 1961 et 1986 à moins de 1 % (40819 tonnes de robusta, 4351 tonnes d'arabica) entre 1987 et 2005 (MINADER, 2008). La culture du café au Cameroun a baissé, contrairement aux autres grands pays producteurs, le Cameroun alors douzième producteur mondial (1996) n'est plus classé à l'échelle mondiale. La vente au plus offrant a entraîné une prolifération d'acheteurs non professionnels, peu préoccupés par la qualité du produit. Les paysans cédant au manque d'exigence des acheteurs, "L'appât du gain facile aidant, se livraient à tous les abus : récolte avant maturité totale, fermentation incomplète, séchage défectueux, mélange de différents grades, etc." Qui sont là des paramètres pouvant induire l'apparition des mycotoxines. Entre 2003 et 2006, le taux de défectuosité des lots proposés à la vente dépassait les 70 % (FAO, 2006).

Dans le commerce international du café, l'un des indicateurs de la sécurité sanitaire du produit exigé est l'absence de l'ochratoxine A (OTA) qui est un métabolite secondaire toxique produit par certaines moisissures essentiellement du genre *Aspergillus* dans les zones tropicales et *Penicillium* dans les zones tempérées (Larsen *et al.*, 2001 ; Castella *et al.*, 2002) fait l'objet des principaux rejets de café dans les marchés mondiaux. Cette

mycotoxine est avec l'aflatoxine B1 (AFB1), la plus surveillée dans l'UE qui est la principale destination du café camerounais. En effet l'absence de l'OTA est exigé parceque ce métabolite possède des effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Mantle et McHugh, 1993 ; Kuiper-Goodman, 1996 ; Höhler, 1998 ; Pfohl-Leszckowicz et Castegnaro, 1999). Les graves risques qu'elle engendre sur la santé des consommateurs ont conduit les instances sanitaires de l'Union Européenne à établir des normes qui définissent les limites maximales tolérables dans plusieurs denrées agricoles (céréales, raisins, café...). Selon le comité scientifique de l'alimentation humaine (FAO/OMS, 2001), il est prudent de réduire l'exposition à l'OTA en dessous de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour. Il convient donc de déterminer comme avec d'autres produits agricoles, les facteurs favorisant l'apparition de l'OTA dans les cerises de café afin de prendre des mesures préventives et de se conformer aux règlements en vigueur. De plus, compte tenu de la concurrence, de la méfiance des consommateurs et face à la globalisation des marchés, les échanges deviennent de plus en plus complexes, contraignant ainsi les producteurs de café à améliorer la qualité de leurs produits. Le concept de traçabilité des diverses denrées alimentaires est devenu dès lors incontournable pour accéder aux marchés de l'Union Européenne et des Etats-Unis en particulier et pour renforcer la confiance du consommateur grâce à la transparence des marchés.

Selon la définition de l'Organisation Internationale de Normalisation, la traçabilité est l'aptitude à retrouver l'historique, l'utilisation ou la localisation d'une entité au moyen d'identifications enregistrées. Ce concept est aujourd'hui devenu, avec la sûreté, une préoccupation constante pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire (Règlement CE 178/2002). Applicable depuis le 1^{er} Janvier 2005, la traçabilité fait maintenant partie intégrante d'une loi définie par le règlement européen 178/2002. Ainsi, identification et traçabilité sont étroitement associées et constituent deux maîtres mots du contrôle de la qualité

des produits agroalimentaires. Dans le souci de garantir l'innocuité et la qualité des denrées alimentaires, certains pays ont promulgué des lois sur la traçabilité des produits alimentaires. A ce titre, le règlement CE 2073/2005 stipule que : Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et résoudre les points à risque, respecter la réglementation, effectuer des autocontrôles; les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène; les consommateurs doivent être informés de la nature des produits et des problèmes sanitaires liés à ces derniers.

Par ailleurs, le Cameroun compte sur l'augmentation des productions agricoles pour la relance de son économie dans la perspective de l'atteinte de l'émergence à l'horizon 2035. Il devra donc se conformer aux réglementations en vigueur, car la traçabilité est devenue un élément incontournable dans la gestion de la chaîne d'approvisionnement, de la gestion du risque et de la qualité. Les documents sur la qualité des normes ISO font référence à la traçabilité et laissent entrevoir un futur tout « tracé ». L'application de ce concept risque de créer un certain nombre de barrières commerciales en particulier pour les pays qui n'ont pas les moyens de mettre en place des systèmes perfectionnés de traçabilité. Jusqu'à présent, l'origine géographique des aliments s'appuie essentiellement sur les documents (certificats phytosanitaires, registre...), en cas de perte ou de vol de ces derniers, il serait difficile de retrouver l'origine exacte du produit incriminé car les exploitants devraient être en mesure de remonter la filière et d'identifier le ou les fournisseurs. Il devient donc impératif de rechercher des marqueurs stables et inhérents de traçabilité.

L'origine géographique d'un aliment peut être révélée par l'identification variétale de l'aliment utilisé, la présence de parasites spécifiques ou par la caractérisation de la flore microbienne spécifique du milieu où l'aliment a été prélevé (El Sheikha *et al.*, 2009). Les deux principales questions de recherche auxquelles nous avons voulu répondre sont :

- Comment varie les teneurs en OTA du café camerounais au cours des procédés de transformation?
- Y a-t-il des variations dans les cartographies du profil fongique des différentes zones de production de café au Cameroun?

Pour répondre à ces deux questions, le présent travail a eu pour objectif général de déterminer les teneurs en OTA, d'identifier et de mettre en œuvre une méthode utilisant la PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) comme outil de traçabilité géographique du café camerounais destiné à la consommation et à l'exportation, afin d'assurer sa sécurité sanitaire.

Spécifiquement, il s'agira dans ce travail de :

1. Evaluer la teneur en OTA des cerises de café.
2. Evaluer la contamination en moisissures des échantillons de café.
3. Construire une banque de donnée moléculaire permettant de remonter à l'origine géographique du café camerounais.

Ces objectifs spécifiques sont basés sur les hypothèses suivantes :

- A. L'OTA dans le café camerounais dépasse les normes dans les marchés européens.
- B. Le taux de contamination en OTA est lié au profil fongique.
- C. La diversité fongique peut être utilisée pour remonter l'origine géographique du café.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I. LE CAFE

I.1 Eléments botaniques, écologiques et répartition géographique

Le café appartient à la famille des *Rubiaceae*, laquelle comprend plus de 500 genres et 800 espèces. L'arbuste (nommé caféier) est une plante pérenne du genre *Coffea* dont la hauteur peut atteindre 8 m. Il existe soixante-dix espèces botaniques, dont les plus connues sont *Coffea arabica* Linné et *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner dont *Coffea robusta* Lindon est une variété (Coste, 1995).

Pour une bonne croissance, le caféier requiert le climat chaud et humide des régions tropicales ou subtropicales. La culture du caféier trouve son terrain de prédilection dans la ceinture équatoriale délimitée par les 30° parallèles Nord et Sud (Figure 1). A floraison, les fleurs se disposent par groupes et donnent naissance à des fruits communément appelés cerise (Figures 2 et 3). Les cerises mesurent jusqu'à 10-18 mm de longueur et 10-25 mm de diamètre.

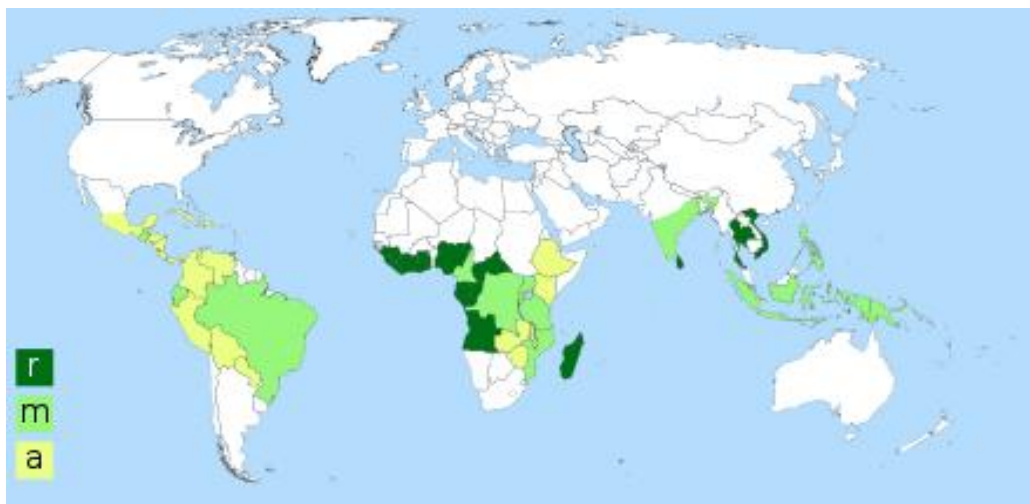


Figure 1 : Répartition géographique des différentes cultures de café (r : robusta, a : arabica, m : robusta et arabica) (Marc Fortier et Charveriat, 2001)



Figure 3 : Photo des fruits de caféier (*Coffea arabica*) en maturation



Figure 2 : Photo des fleurs de caféier (*Coffea arabica*)

I.2. Structure de la graine de café

La cerise du café est classée dans les drupes, c'est-à-dire les fruits à mésocarpe charnu et à endocarpe ligneux. D'un point de vue morphologique, la drupe de café est un fruit ellipsoïdal (d'environ 1 x 2 cm) contenant deux noyaux bombés sur une face et plats sur l'autre. La prolifération cellulaire durant la phase d'accroissement du fruit reste très limitée car l'épaisseur du mésocarpe n'excède jamais 2 mm. Au cours de la maturation, le fruit passe d'une couleur verte au rouge ou orange intense selon les espèces. Ce fruit est composé, comme toutes les drupes, d'un péricarpe qui recouvre l'endosperme (grains). Ce péricarpe est constitué d'un exocarpe (peau), d'un mésocarpe (pulpe et tissu mucilagineux) et d'un endocarpe (parche). La figure 4 présente la coupe d'une cerise de café.

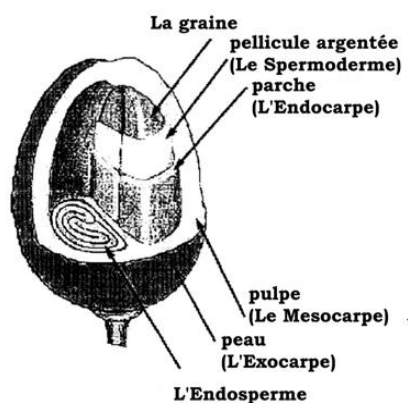


Figure 4 : Coupe d'une cerise de café. (Bytof *et al.*, 2000)

I.2.1. Le mésocarpe externe

Le mésocarpe externe, souvent appelé pulpe, est composé de cellules parenchymateuses de petite taille à parois primaires et de diamètre croissant en allant vers l'intérieur du fruit. Les parois des cellules du mésocarpe externe de café sont compactes et denses lorsque le fruit est vert et après subissent une «fonte» ou amincissement des régions intercellulaires. Ce mécanisme appelé dégradation autolytique est responsable de la texture et de la succulence des fruits charnus (Ouguerram, 1989).

La composition chimique du mésocarpe externe (ou pulpe) varie selon la maturité et l'espèce des fruits analysés. La teneur en eau varie également selon le mode de traitement des fruits de 62 à 76%. Les sucres réducteurs représentent environ 12% de la matière sèche avec une prédominance de fructose. La pulpe de café, par sa composition en glucide et protéines, constitue un sous-produit valorisable en alimentation animale malgré la présence de facteurs antinutritionnels (caféine et composé phénoliques) (Cliford, 1991). Son utilisation par compostage organique a également été envisagée pour l'agriculture.

I.2.2. Le mésocarpe interne

Le mésocarpe interne est une organisation tissulaire avec des cellules à parois fragiles et jointives de type primaire, riche en substances peptidiques (Garcia *et al.*, 1991), il représente environ 20% de la matière fraîche et 55% de la matière sèche du fruit. Son épaisseur varie de 40 à 700 µm selon les espèces et peut atteindre 2 mm pour les cafés de haute altitude.

I.2.3. L'endocarpe

L'endocarpe est un tissu secondaire lignifié d'environ 150 μm d'épaisseur. Sous la parche, une fine membrane appelée pellicule argentée (ou épiderme interne) recouvre deux graines de tissu parenchymateux de réserve portant un sillon central sur leur face plane (Avallone *et al.*, 2002).

I.2.4. Le grain

Le café vert obtenu en fin de procédé peut être de couleur verte, jaune, brune et parfois bleutée. La composition biochimique du café vert a été largement décrite dans la littérature puisqu'elle est directement responsable de la qualité du café torréfié et de la boisson obtenue. Les grains de café vert contiennent en moyenne 60% de glucides, 5% de ligno-celluloses, 13% de lipides, 7% d'acides chlorogéniques, 1% de trigonelline, 0,8-2,8% de caféine et 1% de protéines hydrosolubles.

Les glucides sont principalement constitués de polysaccharides (40-50%) et de sucres (5-10%) dont l'évolution a été étudiée lors de la torréfaction et de la préparation de la boisson (Silwar et Lüllmann, 1988). Les trois types principaux de polysaccharides sont : les arabino-galactanes, les mannanes et la cellulose. Parmi les glucides de petit poids moléculaire, le saccharose est le plus abondant ; il est estimé de 2 à 5% dans le café robusta et 5 à 8,5% dans l'arabica (Bradbury, 2001b).

Les acides organiques du café vert sont responsables de l'acidité du café torréfié, attribut qui exerce une influence essentielle sur le goût du breuvage (Maier, 1987). Ils sont principalement représentés par les acides quinqués (5,5 g.kg^{-1} pour l'arabica et 3,5 g.kg^{-1} pour le robusta) ; maliques (5,6 g.kg^{-1} pour l'arabica et 3,0 g.kg^{-1} pour le robusta) ; citriques (12,3 g.kg^{-1} pour l'arabica et 8,6 g.kg^{-1} pour le robusta), mais également par des traces d'acide

phosphorique, succinique, lactique et glycolique (Balzer, 2001). Les acides chlorogéniques comprennent un groupe de composés formés principalement par l'estérification de l'acide quinique avec des acides caféique, férulique ou *p*-coumarique (Trugo *et al.*, 1991). Ce sont des composés important dans la qualité du café parce qu'ils contribuent largement dans la formation de composé appartenant aux purines (1, 3, 7 triméthylxanthine). Le café vert contient entre 0,8 et 2,8% de caféine. Ce composé est responsable de 10 à 30% du goût amer du café boisson (Heilman, 2001). L'action physiologique du café sur l'organisme est en partie attribuée à sa teneur en caféine. C'est la composante du café qui a été le plus largement étudiée. De ce fait, cette caractéristique prend une importance croissante pour les cafés décaféinés. Les sélectionneurs de caféiers sont ainsi amenés à rechercher des cafés contenant naturellement peu ou pas de caféine (Charrier et Berthaud, 1975).

I.3. Valeur nutritive et propriétés Thérapeutiques du café boisson

La boisson préparée par passage d'eau chaude à travers du café moulu donne un liquide ayant perdu ses glucides, lipides et protéines et donc très peu énergétique mais ayant conservé ses polyphénols et sa caféine. Une grande tasse de café (200 ml) procure environ 175 mg d'acides chlorogéniques. La boisson de café a un contenu en polyphénols totaux de 323 mg/g, elle fait partie avec le vin rouge, des boissons ayant la plus grande activité antioxydante, avec un indice ORAC total de 2541 $\mu\text{mol TE.g}^{-1}$, et très au-dessus du thé vert (Leonard *et al.*, 1997).

En thérapeutique, le café contient de la caféine qui est un alcaloïde ayant des propriétés stimulantes (Costentin et Delaveau, 2010). Plus on consomme le café, plus les risques de diabète de type II diminuent (9 tasses/jour) (Van Dam et Hu, 2005). Cela semble être vrai tant pour le café normal que pour le café décaféiné et le thé (Huxley *et al.*, 2009). Le café inhibe le facteur de transcription NF- κ B dont l'activation constante pourrait contribuer à la

perte de sensibilité à l'insuline (caractéristique du diabète de type II) (Yi-Fang *et al.*, 2011). Ces effets pourraient être liés (au moins en partie) à la présence d'acide chlorogénique. Une corrélation entre consommation (4 tasses/jours) de café et diminution du risque de goutte chez les hommes a aussi été suggérée, le café serait bénéfique également contre la maladie d'Alzheimer (Farah et Donangelo, 2006). Et la présence d'antioxydants comme l'acide chlorogénique dans le café préviendrait les dégâts cellulaires dus aux radicaux libres (Johnston, 2003).

I.4. Importance économique du café

Le secteur du café donne du travail à plus de 100 millions de personnes. 25 millions d'entre elles sont impliquées dans la culture et la récolte du café. Le café figure toujours dans les statistiques du commerce mondial comme une des denrées échangées les plus importantes. En moyenne, on récolte dans le monde environ $7,5 \cdot 10^6$ t/an. L'Amérique du Sud en fournit presque la moitié. De cette production mondiale, environ $5,4 \cdot 10^4$ t sont exportés. Le reste est destiné à la consommation locale ou au stockage. La figure 5 donne la production mondiale de café des années caféières de 2005/2006 à 2008/2009.

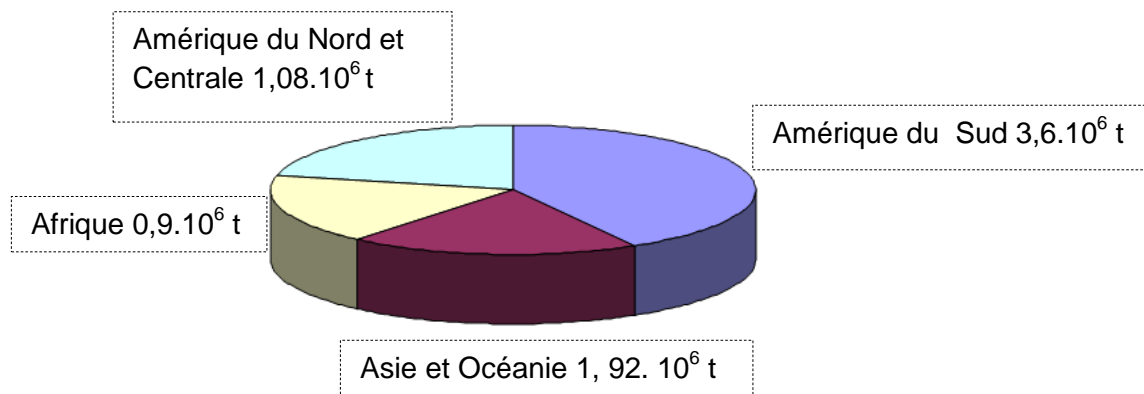


Figure 5 : Production mondiale de café

(moyenne des années caféières de 2005/2006 à 2008/2009)

En Afrique, la production de café ($0,9.10^6$ t) a généré un chiffre d'affaire d'environ 1800 000 000 000 de francs CFA durant les campagnes 2008/2009 ; au Cameroun à cette même période les recettes apportées par l'exportation de café ($0,48.10^6$ t) étaient d'environ 230 000 000 000 de francs CFA.

Le café est la culture commerciale par excellence, il est produit exclusivement au Sud mais se consomme essentiellement au Nord. Les pays industrialisés consomment environ 70 % du café produit dans le monde. Les États-Unis sont les plus gros consommateurs, mais l'Europe a la consommation par habitant la plus élevée : jusqu'à 10 kg par habitant et par an dans les pays scandinaves. En comparaison, la majorité des pays du Sud a une consommation annuelle inférieure à 4,5 kg/hab. En Amérique centrale, plus de 90 % du café est destiné à l'exportation. Toutefois, la consommation de certains pays du Sud, comme le Brésil, augmente rapidement.

I.5. La microflore du café

I.5.1. Dans le fruit

Silva *et al.* (2000) dans leurs travaux ont montré que la microflore naturelle des cerises de café au cours de la voie sèche se compose des micro-organismes saprophytes, généralement rencontrés à la surface des fruits et dans le sol entourant les caféiers. Parmi les 764 isolats, 164 sont des bactéries gram-négatives dont les genres les plus fréquents sont : *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Serratia* ; 191 isolats sont des bactéries gram-positives appartenant aux genres *Bacillus*, *Cellulomonas*, et plus rarement, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brochothrix*, *Dermabacter* et *Lactobacillus*. Les genres *Pichia*, *Candida*, *Arxula* et *Saccharomycopsis* ont été isolés le plus fréquemment parmi les 107 isolats de levures. Enfin, 292 souches de moisissures ont été trouvées, avec les genres *Cladosporium*, *Fusarium* et *Penicillium* (Suarez-Quiroz *et al.*, 2004).

I.5.2. Pendant la fermentation

L'élimination du tissu mucilagineux adhérent au grain est traditionnellement réalisée par fermentation naturelle. De nombreux micro-organismes peuvent être trouvés pendant la fermentation du café. La charge microbienne dépend des paramètres physico-chimiques (température, pH, activité de l'eau), de la composition du substrat en sucres simples et/ou polysaccharides, mais aussi de l'entretien des appareils utilisés (Avallone *et al.*, 2002). Le tissu mucilagineux, de par sa composition biochimique, constitue un bon milieu de croissance pour les micro-organismes. Des travaux antérieurs ont permis d'identifier la microflore naturelle au cours de la fermentation du café par voie humide réalisés dans deux pays producteurs de café : Mexique et Costa Rica (Avallone *et al.*, 2002), les résultats ont montré que la microflore impliquée dans la fermentation du café est stable d'une région à une autre.

Les bactéries de la flore aérobie mésophile totale isolées au cours de la fermentation dans cette étude sont des souches appartenant aux genres *Klebsiella* (73%) et *Erwinia* (27%) ; certains d'entre elles peuvent fermenter avec production d'acides organiques. Parmi les bactéries lactiques, la plupart des souches identifiées dans cette même étude sont hétéro fermentaires (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*) et produisent des acides lactique et acétique. *Leuconostoc mesenteroides* est la souche majoritaire, cette espèce joue un rôle particulier dans la solubilisation des pectines des parois cellulaires de végétaux. L'apparition de *Lactobacillus brevis* a été observée en fin de procédé (Avallone *et al.*, 2001).

Concernant les levures, les souches rencontrées appartiennent aux genres *Kloeckera*, *Candida* et *Cryptococcus*. La même hétérogénéité de la microflore levurienne est observée quel que soit le mode de dépulpage. Ces souches avaient déjà été citées par d'autres auteurs au cours du processus post-récolte de transformation du café (Frank, 1999). Quant aux champignons, les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ont été isolés à la surface des cerises dépulpees, mais ils ne se développent pas lors de la fermentation.

I.5.3. Dans le café vert

L'évolution quantitative et qualitative de la microflore a été suivie au cours d'un stockage expérimental de café arabica (Multon *et al.*, 1974). Dans cette étude, il a été montré que la population bactérienne initiale des grains de café était de l'ordre de quelques dizaines de milliers par gramme. Concernant la population fongique, divers *Aspergillus* constituent la flore dominante, notamment *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. terricola*, *A. versicolor*, *A. restrictus* ; on trouve aussi des *Aspergillus* du groupe *Glaucus* (surtout *A. ruber* et *A. chevalieri*). Très peu nombreux ont été les *Penicillium* (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. purpogenum*, *P. canescens*), et très rares les autres genres comme *Chaetomium*, *Mucor*, *Scopulariopsis* et *Sporendonema*.

I.5.4. Microflore dans d'autres sous-produits du café

Une étude comparative a été conduite pour évaluer et comparer la microflore naturelle présente dans la pulpe (mésocarpe) et dans la coque du café (Roussos *et al.*, 1995). Les résultats ont montré l'existence d'une grande variété de micro-organismes ; les pourcentages de distribution des moisissures, bactéries et levures sont similaires dans tous les échantillons, à l'exception de la coque du café où la population fongique a été la plus abondante. Les genres isolés le plus fréquents appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* et *Humicola* (Noonim *et al.*, 2008).

I.6. Les traitements post-récoltes

Avant de pouvoir torréfier la fève de café, il est nécessaire d'enlever les membranes qui l'enveloppent et d'amener la graine à un degré d'humidité suffisamment bas pour qu'elle puisse être stockée puis transportée vers les pays consommateurs. Pour ce faire, deux méthodes sont utilisées : la préparation par voie humide, terme générique couvrant plusieurs opérations, dont une fermentation ; et la voie sèche (préparation naturelle) qui prévoit le séchage au soleil des fruits entiers (Suarez-Quiroz, 2004). Ces deux termes génériques masquent des variations notables à l'échelon régional et local dans la conduite des opérations.

En Amérique Centrale, la transformation du café cerise en café parche est effectuée dans des usines appelées « Beneficios » qui sont situées dans les zones caféières et centralisent le traitement du café. Leur taille est semi-industrielle, voire industrielle. Les cerises sont récoltées rouges, en général à la main, puis amenées en fin de journée au « Beneficio » où elles sont pesées et traitées (Suarez-Quiroz, 2004).

I.6.1. Transformation des cerises par voie sèche

Dans les régions où l'on pratique la préparation naturelle, on récolte les cerises mûres généralement en plusieurs passages. Cette voie de transformation comporte une étape de séchage ; ce séchage est naturel, au soleil, ou artificiel, en séchoir plan ou rotatif. Le séchage au soleil peut être effectué selon le cas sur une surface couverte de terre compactée, sur des terrasses en terre cuite ou en ciment, ou de manière plus générale sur une surface bien exposée. Le café ainsi préparé est appelé à ce stade café en coque ou café coque, il a une teneur en eau d'environ 12%, il peut être transporté et entreposé tel quel ou bien décortiqué et stocké sous forme de café vert. Le café ainsi obtenu est appelé café non lavé ou café naturel.

I.6.2. Transformation des cerises par la voie humide traditionnelle

Les méthodes par voie humide nécessitent une maturation uniforme des fruits, aussi faut-il recourir à la cueillette et au triage manuel. Cette transformation est plus longue et nécessite plus de soins. En revanche, elle a l'avantage de donner un café vert de meilleur aspect et de meilleures caractéristiques organoleptiques (Suarez-Quiroz, 2004).

I.6.2.1. Flottaison

Souvent, la première opération du procédé est la flottaison. La récolte du jour est plongée dans de grands bacs ou cuves remplis d'eau. Le café parfaitement mûr, étant plus lourd, se concentre au fond de la cuve. Les branchettes et les fruits légers (piqués, immatures ou noirs) flottent et sont évacués par débordement de l'eau. Ces fruits de mauvaise qualité sont traités ultérieurement par la voie sèche, ce qui n'est pas une pratique à conseiller car elle conduit au café de qualité médiocre (Suarez-Quiroz, 2004).

I.6.2.2. Dépulpage des cerises

La peau et la plus grande partie du mésocarpe pectiné sous-jacent du fruit mûr sont éliminés par une opération mécanique, appelée dépulpage (Suarez-Quiroz, 2004). Les cerises de café sont amenées via un courant d'eau ou par un élévateur au-dessus du dépulpeur, entassées dans des trémies, puis déversées progressivement sur les dépulpeurs qui séparent la pulpe du reste de la graine. La séparation s'effectue au niveau de la partie fragile du mésocarpe où les parois cellulaires sont très fines. Traditionnellement, le dépulpage était réalisé en présence d'eau, mais de nouveaux appareils fonctionnant à sec ont été développés afin de diminuer les quantités d'eau utilisées lors du procédé. Les dépulpeurs mécaniques ou électriques fonctionnent par friction de la cerise sur un disque ou un tambour. La pulpe est ensuite stockée pour être valorisée ultérieurement et les cerises déulpées sont transportées par des canalisations d'eau vers la zone de démulcination.

I.6.2.3. Fermentation naturelle

L'élimination de la couche mucilagineuse adhérent au grain est traditionnellement réalisée par fermentation naturelle. La fermentation naturelle du café est réalisée sur des quantités variables (de 50 kg à plusieurs tonnes) en fermentation solide ou liquide avec immersion totale de la masse fermentaire. Les fermentations sont dites « aérobies » lorsqu'elles sont réalisées en milieu solide avec diffusion partielle d'oxygène au niveau des espaces interstitiels entre les grains de café. Les fermentations sont considérées « anaérobies » lorsque la masse est complètement recouverte d'eau car la diffusion de gaz est limitée. Wootton en 1963, conseille de pratiquer des fermentations en deux étapes : tout d'abord une fermentation solide pour acidifier suffisamment le milieu, puis une deuxième étape sous eau afin de permettre aux changements biochimiques intrinsèques au café vert de se produire. Lorsque l'eau qui est utilisée pour recouvrir la masse fermentaire est fortement

polluée, la demande en oxygène est telle que la fermentation est alors assimilée à une fermentation complète. La durée varie de 24 à 90 h selon les conditions d'humidité, de température environnante et de maturité des fruits. L'arrêt est décidé subjectivement lorsque la texture au toucher du tissu mucilagineux est passée de visqueuse à « crissante » sous les doigts. La sur-fermentation, provoque des modifications des caractéristiques biochimiques du grain et induit les développements de mauvais goûts dans le café boisson obtenu (Menchù et Rolz, 1973 ; Barel et Jacquet, 1994).

La durée de la fermentation peut être écourtée par l'apport de pectinases commerciales, principalement obtenues à partir d'*Aspergillus niger*, comme Ultrazyme ou Pectozyme (Arunga, 1973). Elles peuvent fluidifier en 5 ou 6 h la couche mucilagineuse. Cependant leur coût limite leur utilisation. Après la fermentation, l'élimination du mucilage et des produits de dégradation est réalisée par un lavage.

I.6.2.4. Lavage du café

Le café est lavé dans des bains d'eau où il est agité par des turbines afin de décoller les restes de mésocarpe. En fin d'opération, le café parche humide a une teneur en eau d'environ 55%. Enfin le séchage conduit au café parche sec (12% d'eau).

I.6.3. La voie humide « écologique »

Traditionnellement, 40 litres d'eau sont utilisés pour le traitement de 1 kg de café parche pour les étapes de lavage, de dépulpage et de transport des cerises. Ces eaux sont une source de pollution au niveau des nappes phréatiques qu'elles contaminent. De nombreuses alternatives sont proposées pour diminuer les quantités d'eau utilisées avec des procédés comme le dépulpage sans eau et l'élimination du tissu mucilagineux par abrasion (démucilagination mécanique) (Bailly *et al.*, 1992). Très souvent nommée voie humide

écologique, cette méthode utilise un dépulpeur conique vertical en présence d'une faible quantité d'eau. L'élimination du tissu mucilagineux est réalisée mécaniquement par abrasion avec un démucilaginateur vertical ascendant. Cependant, le fait de supprimer l'étape de fermentation microbienne risque d'entraîner des modifications physico-chimiques et organoleptiques sur le café (Puerta-Quintero, 1999).

I.6.4. Le séchage

Le séchage constitue une étape importante et délicate dans la préparation du café. Il contribue fortement à la qualité finale du produit (Barel et Jacquet, 1994). Le café est séché naturellement au soleil par étalement sur des aires cimentées ou sur des claies ; il est conseillé de réaliser un séchage en couche peu épaisse, des remuages fréquents, et d'éviter la ré-humidification ce qui élimine les dangers d'apparition de moisissures.

Le séchage se fait dans des séchoirs plans ou rotatifs. La meilleure température pour l'air de séchage est de 45°C. Lorsque les conditions climatiques le permettent, la totalité du séchage est naturelle ou bien, naturelle suivie d'un séchage artificiel. A la fin du séchage, les grains de café ont un taux d'humidité d'environ 11 à 12% (Suarez-Quiroz, 2004).

I.6.5. Décorticage et déparchage

Le café coque et le café parche sont libérés de leurs enveloppes au cours du décorticage (café coque) ou du déparchage (café parche) (Barel et Jacquet, 1994). Pour ces opérations, on utilise des appareils à percussion ou des décortiqueurs constitués de palettes rotatives qui obligent le café entouré de son enveloppe à passer au travers d'une « poitrinière » perforée, d'une grille ou d'une cage à barreaux où l'enveloppe se brise.

I.6.6. Triage

Le café vert obtenu est ensuite soumis aux triages, granulométrique densimétrique et colorimétrique. Le classement granulométrique permet d'obtenir des grains de même taille, ce qui facilite les triages suivants, la torréfaction, et l'élimination des défauts qui sont concentrés dans les catégories inférieures.

Le triage densimétrique permet d'éliminer les fèves les plus légères (piquées, malformées, avortées, etc...), les brisures, les morceaux d'enveloppe, les grains non décortiqués, les pierres, etc. Cette opération est pratiquée à l'aide de « catadors », machines qui font un nettoyage par flux d'air ou, mieux, de tables densimétriques.

Le triage colorimétrique permet de séparer les grains qui ont une couleur indésirable (grains noirs, blancs ou bruns). Le triage colorimétrique peut être manuel ou avec une machine électronique qui projette une lumière sur les grains. Le triage électronique est une technique colorimétrique basée sur la mesure de la différence de réflectance entre le grain et une référence. L'utilisation de deux longueurs d'onde différentes permet d'éliminer des grains de couleurs différentes (fermentés ou pourris) qui donnent des mauvais goûts au café (Full *et al.*, 1999).

I.6.7. Stockage

Le café est stocké avant d'être torréfié ; ce dernier stade demande beaucoup de précautions pour que la denrée conserve toute sa qualité et donne une boisson aromatisée (Petraco, 2001). Pour garantir une bonne conservation du café, il est nécessaire de stocker un café bien sec avec un degré d'humidité faible (11-13%, environ 0,55-0,65 d'humidité relative à l'équilibre) et uniformément réparti, conditions dans lesquels il n'y a pas croissance microbienne. Des travaux dans un système modèle ont montré que l'eau pouvait être

rapidement redistribuée en phase gazeuse dans une masse de grains de café verts (Frank, 2001).

I.6.8. Torréfaction

La torréfaction est une opération qui consiste à amener avec rigueur le grain de café vert au juste degré de grillage souhaité, soulignant ainsi les qualités principales du café : arôme, couleur et corps. Cette transformation du café est menée sous l'effet de la chaleur. Des réactions chimiques se développent, accompagnées de modifications morphologiques (destruction des acides chlorogéniques, changement de couleur et augmentation du volume des grains).

La torréfaction se fait par chauffage direct, par chauffage indirect ou par fluidisation dans un courant d'air chaud. Le chauffage indirect est le procédé le plus utilisé dans l'industrie du café. Au cours de la torréfaction, on distingue deux phases : la première phase correspond au séchage (température des grains aux environs de 100°C). Au cours de cette phase, les réactions sont endothermiques. La seconde phase appelée torréfaction est exothermique (température du grain comprise entre 160 et 260°C). C'est elle qui provoque les réactions de dégradation et de polymérisation de certains composés précurseurs d'arômes (Illy et Viani, 1998). Les réactions génèrent du gaz carbonique et des composés volatils. Les réactions endothermiques se font aux environs de 210°C. C'est lors de cette phase qu'on peut entendre le craquement des grains de café dû à la pression interne. C'est la fin de la torréfaction. Cette étape doit être suivie rapidement d'un refroidissement afin d'arrêter la torréfaction au degré voulu et d'éviter un grillage important qui détériorerait les arômes (Guyot, 1993).

I.7. La boisson

Le café boisson se présente sous différentes formes, variant des solutions pures (ex. café filtré) aux émulsions (ex. café par décoction) et aux fortes suspensions (ex. le café style turc). L'effervescence, quand elle est présente, se traduit par la formation de bulles de gaz. La formation en surface d'une couche de mousse est due à la matière grasse (expresso). Un certain nombre d'additifs peuvent être ajoutés à la boisson basique, lesquels sont dispersés dans une phase homogène (ex. le sucre) et quelque fois donnent un système multiphasé (ex. du lait dans le cappuccino).

La FAO estime qu'environ un quart des récoltes de la planète est susceptible d'être contaminée par les mycotoxines (FAO, 2006). Une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de ces toxines. Les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation...), s'ils agissent sur les moisissures, ne détruisent pas ou très peu la plupart des mycotoxines. D'où l'intérêt que nous portons à ces métabolites.

II. MYCOTOXINES ET MYCOTOXINOGENESE

II. 1. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par certaines souches de moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits). Plus de 300 mycotoxines ont pu être identifiées et environ une trentaine de ces molécules a une véritable importance en termes de santé animale et humaine (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

La présence inévitable des mycotoxines dans la nature fait qu'il est particulièrement difficile de garantir l'innocuité des aliments. Selon l'organisation des Nations Unies pour

l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), au moins 25% des cultures vivrières dans le monde sont contaminées par des mycotoxines. Les plus touchées sont le raisin et ses dérivés, les céréales et leurs dérivés, le cacao, le café, les arachides. Le volume mondial de produits à risque est estimé à 100 millions de Kg dans les pays en de développement (Park et Boutrif, 1999).

Les mycotoxines sont souvent classées en fonction des espèces fongiques qui les produisent et des produits qu'elles contaminent. De nos jours, environ 300 mycotoxines différentes ont été isolées et caractérisées. Les plus communes dans les aliments et les plus importantes au niveau sanitaire et économique sont les aflotoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la zéralénone, les fumonisines, les alcaloïdes de l'ergot, la citrine, la patuline et la stérigmatocystine (Gimeno, 2000). Les principales mycotoxines, les espèces productrices et les denrées associées sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Espèces fongiques toxigènes contaminants les denrées alimentaires et mycotoxines associées.

Mycotoxines	Principales espèces fongiques	Principales denrées alimentaires contaminées
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Arachides, céréales, fruits, fruits secs, lait
Trichothécènes	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Céréales, légumineuses
Alcaloïde de l'ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Céréales
Acide cyclopiazonique	<i>A. flavus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. expansum</i>	Céréales
Citrine	<i>P. citreoviride</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Monascus purpureus</i>	Céréales et fruits
Deoxynivalénol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Céréales
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i> (<i>veridicatum</i>), <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. terreus</i>	Vin, raisin, café, cacao, céréales...
Stérimatocystine	<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i>	Céréales
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs)
Patuline	<i>A. cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. granulatum</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i> , <i>paecilomyces varioti</i>	Céréales et fruits
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. semitectum</i>	Céréales

Sources: Li *et al.*, 1997, Engelhardt *et al.*, 1999, Pascale *et al.*, 2000, Peraica *et al.*, 2000, Delage *et al.*, 2003, Büniger *et al.*, 2004, Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005, Hymery *et al.*, 2006.

II.2. Mycotoxicogénèse

Les voies de biosynthèse des mycotoxines ne sont pas toutes bien élucidées. La méthode moléculaire est une méthode d'avenir pour leur étude (Taylor *et al.*, 1999). Le séquençage de l'ADN a permis la préparation d'amorces ou de sondes spécifiques des espèces productrices (Edwards *et al.*, 2002). La PCR, ainsi que la RAPD (Random Amplification of

Polymorphic DNA) ont été utilisées pour l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines (Morin *et al.*, 1999 ; Lopes *et al.*, 2000).

Les moisissures productrices de mycotoxines sont capables de se développer sur plusieurs substrats et dans différentes conditions d'humidité, de pH et de température. Ces moisissures peuvent se développer pendant la culture, le séchage (saprophytes) ou pendant le transport et stockage (endophytes) des produits agricoles. De plus, certaines moisissures sont capables de synthétiser plusieurs mycotoxines (Eskola, 2002). Trois types de facteurs conduisent à la contamination fongique et à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée : il s'agit des facteurs physiques, chimiques et biologiques (D'Mello *et al.*, 1997).

II. 2.1. Facteurs physiques favorisant la présence de mycotoxines

Activité de l'eau (A_w)

La toxinogénèse est fortement liée à l'activité de l'eau (A_w). Quand les autres facteurs ne sont pas limitants, la toxinogénèse croît d'une façon exponentielle avec l' A_w jusqu'à un maximum où on observe un ralentissement de la toxinogénèse due à un défaut d'oxygénation (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004). Les conditions optimales de toxinogénèse sont fonction de l'espèce et de la nature du substrat. L' A_w optimale pour la croissance d'*Aspergillus ochraceus* se situe entre 0,95 et 0,99 sur des milieux riches en sucre et 0,81 sur des milieux contenant du NaCl. Elle est de 0,82 chez *A. carbonarius* et est inférieure à 0,80 chez *Penicillium verrucosum* dans les mêmes conditions (Pitt et Hocking, 1997).

Température

La température optimale de toxinogénèse est généralement voisine (légèrement inférieure) de la température optimale de croissance des souches productrices (Samson *et al.*,

2004). *Aspergillus ochraceus* est une espèce mésophile - xérophile. Il se développe entre 8 et 37°C, avec un optimum entre 24 et 37°C. Peu d'informations sont disponibles sur *A. carbonarius* car sa capacité à produire l'OTA n'a été rapportée que récemment. Des études préliminaires récentes indiquent des conditions optimales entre 32 et 35°C (Téren *et al.*, 1996 ; Varga *et al.*, 1996 ; Heenan *et al.*, 1998). *Aspergillus niger* se développe de façon optimale à des températures hautes, avec un optimum entre 35-37°C. *Penicillium verrucosum*, quant à lui, est capable de croître à basse température (entre 0 et 31°C, l'optimum est à 20°C). La patuline, l'acide pénicillique et l'OTA sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance. Les températures optimales de croissance et de production d'aflatoxines chez *A. flavus* sont proches et se situent à 24 °C (Samson, 1991). Pour d'autres toxines (trichothécène et zéaralénone), la température optimale de toxinogénèse peut être jusqu'à 10°C inférieure à celle de la croissance (Samson, 1991).

II.2.2. Facteurs chimiques favorisant la présence de mycotoxines

Oxygène

Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

Traitements agricoles

L'utilisation des produits phytosanitaires sur les plantes pendant les traitements agricoles a une action préventive sur l'apparition des mycotoxines. L'emploi des insecticides protège des lésions dues aux insectes et acariens et réduit la contamination par les souches toxinogènes ou la production des mycotoxines (Blateyron *et al.*, 2001 ; Molot, 2003).

Composition du substrat

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002).

II.2.3. Facteurs Biologiques

Les facteurs biologiques sont liés à l'espèce fongique, à la spécificité et la variation de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces qui peuvent être de genres différents. C'est notamment le cas de la patuline et de l'OTA qui sont produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Une même espèce peut également produire plusieurs toxines (production d'OTA et de citrinine par *Penicillium verrucosum* ; d'OTA et d'acide pénicillique par *Aspergillus ochraceus* ; de citrinine et de patuline par *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus*) (Le-Bars, 1988). Au sein d'une espèce réputée toxigène, toutes les souches peuvent ne pas avoir cette propriété. La fréquence de souches toxigènes dépend de l'espèce fongique. Pour une même espèce, la production des toxines peut dépendre de la région et du substrat d'origine (Kokkonen *et al.*, 2005).

A côté de tous ces facteurs qui sont généraux aux mycotoxines, il faut relever que chaque souche toxigène a une physiologie différente et par conséquent un habitat écologique différent.

III. L'OCHRATOXINE A

III.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques

L'Ochratoxine A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) [7-(L- β -phénylalaninyl-carbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine] est une isocoumarine liée par un groupement carboxy à une L- β -phénylalanine. (Figure 6) (Ringot *et al.*, 2006).

Formule brute: $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

Masse moléculaire : 403,8 g/mol

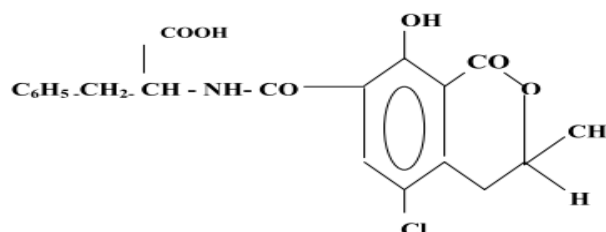


Figure 6 : Structure de l'Ochratoxine A (Ringot *et al.*, 2006)

C'est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mole, ayant un point de fusion de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. Le spectre d'absorption UV de l'OTA varie avec le pH et la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5 500 mol/cm dans l'éthanol. Elle a un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96 % et à 428 nm dans l'éthanol absolu (Steyn, 1993 ; Scott, 1994 ; Jiménez *et al.*, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

L'OTA est un acide faible. Elle est soluble dans les solvants organiques polaires et dans des solutions aqueuses de bicarbonate sodique. Sous forme de sel sodique, l'OTA est soluble dans l'eau (OMS, 1990). Le pKa du groupe de la phénylalanine est de 4,8, et celui du phénol 7,1 (Dall'Asta *et al.*, 2004). Généralement, l'OTA est stable et peut être conservée au réfrigérateur sous forme dissoute dans l'éthanol ou du méthanol. Plusieurs études montrent sa stabilité vis-à-vis de la température et des radiations γ quand elle est en solution dans du

méthanol (Scott, 1994 ; Valenta, 1998). Pour être complètement hydrolysée, l'OTA doit subir un chauffage sous reflux pendant 48h en présence d'HCl 6M (Stander *et al.*, 2000a).

Composés dérivés de l'OTA

L'OTA présente plusieurs analogues qui peuvent être naturels ou synthétiques. Les analogues naturels sont constitués de l'Ochratoxine B (OTB) qui est le dérivé non chloré de l'OTA, l'Ochratoxine C (OTC) qui est l'ester éthylique de l'OTA, et l'Ochratoxine α qui est le dérivé isocoumarine obtenu après l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de la phénylalanine (Harris et Mantle, 2001). Avec l'OTA, l'OTC est la plus toxique tandis que l'OTB et l'OT α sont peu toxiques chez l'Homme. Toutefois si l'OT α est très concentrée, elle peut provoquer un échange des chromatides soeurs (Follmann *et al.*, 1995 ; Xiao *et al.*, 1996). Les analogues synthétiques de l'OTA sont constitués de l'épimère d'OTA (d-OTA), l'éthylamide d'OTA (OE-OTA), l'OTA décarboxylée (DC-OTA), l'OTA o-méthylée (OM-OTA), et le méthylester d'OT α (M-OT α) (Xiao *et al.*, 1996).

III.2. Toxicologie de l'OTA

L'OTA agit principalement en inhibant la synthèse des protéines par compétition avec la phénylalanine au niveau de la fixation de cet acide aminé sur son acide ribonucléique de transfert (ARNt) spécifique, catalysée par la phénylalanyl-ARNt synthétase. De plus, l'OTA et ses métabolites se fixent sur l'adénine et surtout sur la guanine. Il en résulte la formation de trois types d'adduits : les adduits classiques, les adduits exocycliques et les pontages. Ces réactions sont à l'origine de plusieurs toxicités graves.

Néphrotoxicité

L'OTA est responsable de l'apparition d'un nombre drastique de tumeurs dans les voies urinaires supérieures rencontrée dans les Balkans. Cette corrélation est établie par

plusieurs études scientifiques (Bordas *et al.*, 1973 ; Chernozemsky *et al.*, 1977; Markovic, 1985; Rouvier, 2002). Des études récentes relèvent également un taux élevé de citrinine au sein de cette population. La néphrotoxicité de l'OTA est démontrée chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes où a été observée une métabolisation de l'OTA.

Tératogénicité

L'OTA peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques variées chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet. Les mécanismes de la tératogénicité induite par l'OTA ne sont pas encore clairement définis. Elle semble être liée à une action indirecte de l'OTA sur la mère, et à un effet direct sur le développement embryonnaire (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999).

Immunotoxicité

Le système immunitaire semble être plus touché par l'OTA que les autres organes qui lui sont sensibles. L'OTA agit sur l'immunité humorale en induisant la régression des immuno-globulines IgG, IgA et IgM. Elle est également responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire transmise par les lymphocytes B et T (immunité cellulaire). Des troubles au niveau de la moelle osseuse ont également été observés chez les animaux à qui l'OTA a été administrée.

Génotoxicité

En fonction de la dose, l'OTA provoque la formation d'adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991). Hennig *et al.* (1991) ont mis en évidence une activité mutagène importante chez *Salmonella typhimurium* exposée au surnageant d'hépatocytes de rats traités (in vitro) par de l'OTA. Ils ont également observé une induction d'échange de chromatides soeurs dans les lymphocytes humains dans un milieu de culture contenant des hépatocytes et

de l'OTA. Dans une culture *in vivo*, des cassures simple-brins sont observées au niveau de l'ADN du rein, du foie et de la rate des rongeurs (Manolova *et al.*, 1990).

III.3. L'OTA dans les aliments

L'OTA contamine plusieurs denrées alimentaires. Elle a été retrouvée dans les aliments d'origine végétale comme le cacao, le café, les céréales (surtout le maïs, le blé, l'orge et le seigle), les épices, les fruits secs et le raisin. A cause de sa thermostabilité (Boudra *et al.*, 1995), l'OTA est également présente dans les produits transformés (chocolat, bière, vin, pain, jus de raisin, etc...) (Miraglia et Brera, 2002). Les céréales, le vin et le café sont les aliments les plus incriminés dans l'ingestion de l'OTA par l'homme. Leurs contributions à l'ingestion journalière d'OTA sont respectivement de 50, 13 et 10 % (Figure 7).

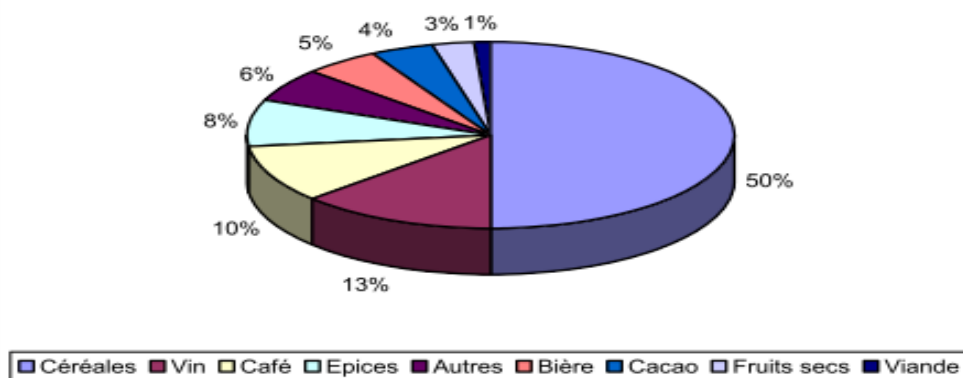


Figure 7: Contribution des différents aliments à l'ingestion de l'OTA en Europe (*SCOOP Task 3.2.7, European 2002*).

L'OTA est également présente dans les aliments d'origine animale. Les produits animaux comme la viande de porc ou de volaille sont des sources indirectes d'OTA chez

l'homme (Miraglia et Brera, 2002). Il en est de même de leurs produits transformés (saucisses, jambon, etc...) (Chiavaro *et al.*, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002). Chez les ruminants, l'apport de l'OTA au régime alimentaire humain est minimal grâce à la mycoflore de leur rumen qui dégrade l'OTA en OT α , un métabolite moins toxique.

Chez l'Homme, des recherches d'OTA faites en France, dans le sérum et le plasma (Grosso *et al.*, 2003), les reins (Petzinger et Weidenbach, 2002), l'urine (Domijan *et al.*, 2003) et le lait (IARC, 1993) révèlent sa présence. Des cas d'ingestion d'OTA par inhalation dans des champs contaminés au Venezuela ont été décrits (Petzinger et Weidenbach, 2002). De plus l'OTA a été détectée dans le sang d'ouvriers travaillant sans masques de sécurité dans les entrepôts de café, cacao, épices, et également dans les locaux mal ventilés en Italie (Iavicoli *et al.*, 2002). Le tableau 2 donne la teneur en OTA dans quelques aliments.

Tableau 2 : Exemples de teneur en OTA dans quelques produits alimentaires

Matrice	Origine	Echantillons analysés	Echantillons positifs (%)	Moyenne ($\mu\text{g/kg}$ ou L)
Céréales et produits dérivés				
Maïs	Europe et Argentine	139	90	0,112
Seigle	Danemark	422	61	0,651
Riz	Espagne	77	13	0,775
Orge	Espagne	52	63	0,198
Blé	Danemark	419	54	0,161
Pain au blé	Inconnu	162	100	0,271
Bouillie	Italie	238	8	0,032
Bière	Belgique	62	3	0,033
Vins et raisins				
Vin rouge	Espagne	28	46	0,088
Vin rosé	Amérique	5	20	0,015
Vin blanc	Europe	18	22	0,013
Raisin	Portugal	11	27	0,168
Raisin sec	Inconnu	85	79	1,81
Cafés				
Café vert	Côte d'Ivoire et Zaïre	4	100	10,9
Café vert	Brésil	135	29	2,09
Café torréfié	Allemagne	419	46	0,99
Café décaféiné	Allemagne	71	37	0,49
Café soluble	Espagne	9	100	0,500
Viande et produits dérivés				
Viande de porc	Danemark	83	82	0,09
Viande de poulet	Danemark	65	55	0,021
Jambon	Italie	42	83	0,838
saucisses	Allemagne	201	48	0,09
fromage	Arabie Saoudite	3	33	0,357
lait	Norvège	87	13	?

Sources : Burdaspal et Legarda, 1998 ; Jorgensen, 1998; Burdaspal et Legarda, 1999 ; Skaug, 1999 ; Scudamore et Patel, 2000 ; Otteneder et Marjerus, 2001 ; Aboul-Enein *et al.*, 2002 ; Beretta *et al.*, 2002 ; Chiavaro *et al.*, 2002 ; Jorgensen et Jacobsen, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Lopez de Cerain *et al.*, 2002, Tangni *et al.*, 2002 ; Araguàs *et al.*, 2003 ; Romani *et al.*, 2003 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Lombaert *et al.*, 2004 ; Rosa *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2005 ; González *et al.*, 2006.

La présence de l'OTA dans le café a été rapportée dès 1974 (Levi *et al.*, 1974).

D'autres études ont rapporté des concentrations qui varient de 0,4 à 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Levi, 1980 ;

Mico *et al.*, 1989 ; Nakajima *et al.*, 1997 ; Leoni *et al.*, 2000 ; Romani *et al.*, 2000 ; Urbano *et*

al., 2001 ; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004). Depuis 1995, un total de 985 résultats sur café torréfié moulu et 359 sur café instantané ont été publiés. La fréquence et la distribution de ces résultats montrent que 71 % des échantillons de café instantané et 83 % de café torréfié moulu contiennent moins de 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Van Der Stegen, 2003).

III.4. Présence d'OTA dans le café en fonction de son origine

Les niveaux de contamination du café par l'OTA varient par rapport aux régions. Cette différence est attribuée aux conditions climatiques de chaque région et aux traitements post-récoltes utilisés. En général, tous les cafés lavés et non lavés provenant d'Amérique Centrale et du Sud ont une faible teneur d'OTA. Des taux plus élevés ont été observés dans le café des pays qui produisent des cafés Robusta ou Arabica non lavés. Cependant, ces observations ne peuvent pas exclure la possibilité que la contamination par l'OTA peut se produire à la dernière étape en raison de mauvaises conditions de transport et de stockage (Heilman *et al.*, 1999).

III.5. Moisissures produisant de l'OTA dans le café

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont supposées produire l'OTA dans le café, mais la source la plus importante de toxine dans le café est attribuée à trois espèces : *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* (Frank, 2001 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Noomin *et al.*, 2008). La distribution de ces trois espèces a été rapportée dans 408 échantillons de café provenant de 4 régions de Brésil. Dans cette étude l'espèce la plus fréquente est *A. niger* (550 isolats) mais seulement 3 % ont été trouvés producteurs d'OTA ; *A. ochraceus* (270 isolats) est aussi fréquent avec 75 % d'isolats capables de produire l'OTA et *A. carbonarius* (54 isolats) a été trouvé seulement dans les régions chaudes avec 77 % de souches productrices de la toxine (Bucheli *et al.*, 2000).

III.6. Facteurs de développement et de toxinogénèse

Des recherches ont été menées pour étudier les conditions et le potentiel de production d'OTA par *A. ochraceus* et *A. carbonarius* dans le café. Mantle et Chow (2000) ont étudié plus en détail la formation d'OTA par des souches d'*A. ochraceus* isolées de café provenant du Brésil, d'Indonésie et d'Inde. Ils ont montré que le café stérilisé est un mauvais substrat pour la production d'OTA. L'humidité, la température, la nature du substrat et quelques autres facteurs jouent un rôle important sur le développement des souches productrices d'OTA et sur leur toxinogénèse (Suarez Quiroz *et al.*, 2004). Les facteurs qui influencent le développement des moisissures pendant le stockage sont l'activité de l'eau et la température (Suarez Quiroz *et al.*, 2004). Les conditions de croissance et de production d'OTA sur café par diverses souches, notamment l'influence de l'activité de l'eau ont été décrites (Taniwaki *et al.*, 2003) et la production d'OTA par *A. ochraceus* en fonction de l' A_w en alternant 2 températures de stockage a été étudiée (Cabrera *et al.*, 2001). Même si plusieurs études ont montré la relation entre la fréquence et le potentiel toxigène des moisissures, en fonction des traitements post-récolte du café, les mécanismes de contamination du café par les souches toxigènes ne sont pas encore clairs (Mantle, 2002). La synthèse d'OTA peut se produire pendant toute la durée du processus post-récolte, le stockage et le transport du café. L'effet inhibiteur de composés présents dans le café comme la caféine sur la production d'OTA a été rapporté (Buchanan *et al.*, 1981 ; Soliman, 2002 ; Suarez Quiroz *et al.*, 2004).

III.7. Législation sur l'OTA

Des enquêtes sur la fréquence et les niveaux de présence de l'OTA dans des échantillons de denrées alimentaires et du sang humain indiquent une forte contamination, d'où l'intérêt d'une législation dans le but de protéger le consommateur. Avant la commission de régulation 188/2007 de l'Union Européenne, seulement 11 pays européens avaient défini

des limites maximales de contamination de divers aliments par l'OTA (Boorman, 1989 ; WHO, 1996 ; SCF, 1998 ; Van Egmond, 1999 ; FEHD report, 2006). Dès lors, beaucoup de progrès ont été faits dans le domaine de la sensibilisation. Les principes de base de la législation communautaire concernant les contaminants dans les aliments sont fixés par le règlement de la Communauté Economique Européenne (CEE) n° 315/93 du conseil du 8 février 1993. Le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CASH) estime qu'il serait prudent de réduire au minimum l'exposition à l'OTA. L'exposition doit se situer dans la partie basse de la fourchette des doses journalières tolérables de 1,2 à 14 ng/kg /²pc/jour, c'est à dire qu'elle soit inférieure à 5 ng/kg de poids corporel/ jour (DGXXIV : SCF, 1998 ; FAO/WHO, 2001 : Règlement CE n° 123/2005).

Le Règlement CE 123/2005 de la commission du 26 janvier 2005 a fixé des limites maximales d'OTA dans certains aliments (Tableau 3).

Tableau 3: Normes d'OTA établies sur certaines denrées alimentaires (CE 123/2005)

Aliment	Spécification	Limite maximale admise (µg/kg)
Céréales	Céréales en grain brut	5,0
	Céréales Produits dérivés ou transformés des céréales	3,0
Raisins	Raisins secs	10,0
	Vins et boissons à base de vin ou de moût de raisin	2,0
	Jus de raisin et boissons à base de jus de raisin	2,0
Café	Café torréfié et café torréfié et moulu	5,0
	Café soluble	10
Aliments pour enfants	Aliments élaborés à base de céréale	0,5
	Aliments diététiques	0,5

La qualité phytosanitaire des produits alimentaires étant devenue une préoccupation majeure pour les professionnels de la santé publique, et avec les nombreuses crises alimentaires qui ont frappés le monde ("vache folle", dioxine...), la justification de l'origine des denrées est depuis lors imposés aux producteurs, d'où les efforts consentis pour assurer la traçabilité agroalimentaire. Ce concept de traçabilité des denrées est devenu incontournable pour accéder aux marchés de l'Union Européenne et des Etats-Unis, et permet de renforcer la confiance des consommateurs grâce à la transparence des marchés qu'elle garantit.

IV. TRAÇABILITE

IV.1. Définition

La traçabilité est l'information permettant le suivi (éventuellement rétrospectif) d'un matériau ou produit sur toute sa chaîne de production et de distribution, jusqu'à sa fin de vie « de la fourche à la fourchette » pour un produit alimentaire. Ce concept est devenu au 1^{er} janvier 2005 l'article 18 du règlement européen 178/2002. Plusieurs définitions ont été données à la traçabilité dont voici les plus importantes.

La traçabilité est définie par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO 9000-2007) comme « l'aptitude à retrouver l'historique, la mise en œuvre ou l'emplacement de ce qui est examiné. Dans le cas d'un produit, elle peut être liée à l'origine des matériaux et composants, l'historique de la réalisation, la distribution et l'emplacement du produit après livraison ».

Il peut y avoir différents modes d'utilisation de la traçabilité. Selon que l'on s'intéresse à l'origine ou à la destination des produits, on parle de traçabilité ascendante ou descendante (Green et Hy, 2002). La traçabilité ascendante « tracing » est la capacité, en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver l'historique, l'origine et les

caractéristiques d'un produit à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment à trouver la cause d'un problème de qualité, à contrôler l'exactitude des caractéristiques d'un produit (agriculture biologique, raisonnée, ...) ou de l'itinéraire du produit.

La traçabilité descendante ou avale « tracking », est la capacité en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver la localisation de produits à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment en cas de retrait ou de rappel de produits s'ils ont un effet nuisible pour la santé publique (GS1 Belgium et Luxembourg, 2006).

IV.2. Enjeux

Cette notion a une importance particulière et grandissante pour les produits concernant la santé humaine, comme l'alimentation et les médicaments ou bien la sécurité (aéronautique, automobile, informatique par exemple).

Elle est utilisée aussi dans le suivi du traitement des déchets, puisqu'un producteur de déchets en est responsable jusqu'à son élimination; elle peut alors aussi concerner les composants et sous-composants d'un objet.

C'est aussi une préoccupation croissante pour le consommateur-citoyen, qui veut par exemple être sûr que le produit ne fait pas intervenir d'éléments contraires à son éthique ou à sa morale, comme par exemple le travail des enfants, la destruction de ressources non renouvelables, une pollution non traitée, un problème religieux, médical etc. C'est un des éléments essentiel de l'écocertification et de l'écosociocertification (du bois et produits dérivés du bois par exemple).

IV.3. Intérêt de la traçabilité

La traçabilité des produits et des composants a reçu une attention critique au cours des dernières années. Les exigences de différents segments de l'industrie alimentaire peuvent varier. Ils ont en commun qu'ils partagent la nécessité d'une documentation sans faille sur le suivi du produit du producteur, au fournisseur et au final au consommateur (Cebeci *et al.*, 2008).

La traçabilité joue un rôle important dans la qualité : si l'on s'aperçoit qu'un élément de production est défaillant, la traçabilité permet de savoir quels produits sont passés par cet élément, d'agir de façon curative sur ceux-ci pour assurer la conformité du produit (résolution des problèmes et remise en conformité, destruction, rappel, etc.) et de réaliser une analyse du problème en amont et aval pour mettre en place des actions correctives. Elle est utilisée par exemple pour prévenir les risques liés aux produits agro-alimentaires, faire face aux possibles contrefaçons de médicaments, ou s'assurer de la non-nocivité de toutes sortes de produits (par exemple des jouets pour les enfants).

En Europe, suite à plusieurs crises, dont celle de l'encéphalite spongieuse bovine, l'Union Européenne (UE) a mis en place le système d'alerte rapide RAPEX, un système informatisé, qui recense tous les produits de consommation dangereux (http://ec.europa.eu/consumers/dyna/rapex/rapex_archives_fr.cfm). De plus, le slogan « De la fourche à la fourchette » a dans les années 2000 recouvert un vaste programme de restructuration et coordination à échelle européenne de « tous les aspects sensibles en la matière, à tous les stades de la filière agro-alimentaire: santé et alimentation animales, qualité des productions végétales (y compris les innovations OGM), sécurité des intrants agricoles (fertilisants, pesticides, etc.), qualité et surveillance des produits et denrées alimentaires transformés mis sur le marché (y compris les règles d'étiquetage), problématique de la sécurité alimentaire dans les échanges internationaux ».

En janvier 2000, la Commission publiait une charte de base, le Livre blanc sur la sécurité alimentaire prévoyant un plan de réformes législatives visant des règles cohérentes et transparentes, un renforcement des contrôles et des avis scientifiques. Tout le droit existant devait être revu et rendu compatible avec la nouvelle juridiction communautaire sur la sécurité alimentaire.

IV.3.1. Les perspectives économiques de la traçabilité

Les perspectives d'un point de vue économique sur la traçabilité reposent sur deux courants fondamentaux: la demande et l'offre. Dans le premier cas, l'objectif est de déterminer la volonté du consommateur de payer pour avoir une traçabilité, dans le dernier cas, il faut réfléchir aux implications de la traçabilité au niveau de l'entreprise. L'objectif de ces études est de déterminer les avantages et les coûts de la traçabilité, de savoir si les mécanismes du marché peuvent être utilisés pour atteindre un niveau efficace de traçabilité, et comment cela influence les relations de pouvoir des entreprises autonomes dans une chaîne d'approvisionnement.

Des coûts sont associés à la mise en œuvre du système (par exemple, les changements dans les procédures, diminution de la souplesse, et une augmentation des niveaux d'automatisation, de l'inventaire, le personnel et la documentation) et de son entretien (grâce à un audit). Les avantages de la traçabilité comprennent une transparence accrue, la réduction des risques de réclamations, une meilleure logistique, un meilleur contrôle des épizooties, d'éventuels effets positifs sur le commerce, les licences de produits plus faciles, et des bénéfices possibles.

En Europe, la traçabilité a été principalement motivée par la réglementation, tandis qu'aux Etats-Unis, la motivation a été plus économique. Il existe plusieurs systèmes de traçabilité dans les industries agro-alimentaires. Les systèmes peuvent être caractérisés par

trois dimensions: la profondeur « jusqu'à quel niveau et en aval du système GOES », par exemple, la largeur « combien d'attributs sont tracés », et la précision « dans quelle mesure l'origine est correctement identifiée » (Golan *et al.*, 2004).

Il existe différentes motivations pour introduire des systèmes de traçabilité: alors que les entreprises privées sont motivées par le profit, les pouvoirs publics sont plus intéressés par le bien-être social (Golan *et al.*, 2003; Hobbs, 2004). C'est pourquoi les consommateurs s'attendent à des différences entre les systèmes de traçabilité mis au point par des entreprises privées et de ceux imposées ou influencés par les pouvoirs publics. Un bon niveau de traçabilité va donc dépendre de l'aspect obligatoire ou volontaire (Golan *et al.*, 2004).

La traçabilité à elle seule ne contribue pas à des niveaux plus élevés de sécurité ou d'autres attributs de la qualité mais elle permet de transférer uniquement des informations le long de la chaîne d'approvisionnement. Pour que la traçabilité puisse affecter la qualité, elle doit être associée à un certain mécanisme d'assurance qualité qui impose un ensemble de normes et de procédures, et précise les données à enregistrer, de sorte que la qualité puisse être assurée. Elle permet le partage de l'information enregistrée par les entreprises, ou par d'autres institutions à laquelle elle est associée, ce qui constitue l'essentiel de tout système de traçabilité (Füzesi *et al.*, 2009).

La traçabilité des aliments a été analysée à travers deux perspectives différentes: la recherche opérationnelle et l'économie. Dans la recherche opérationnelle et en sciences de gestion, la traçabilité est considérée comme un système d'information conçu pour coordonner les informations entre les différentes divisions d'une entreprise, par exemple, pour formuler un problème d'optimisation qui minimise la taille des lots de production en cas de rappel dû à un danger (Souza-Monteiro et Caswell, 2004).

IV.4. La traçabilité agroalimentaire

La traçabilité agroalimentaire est l'application des principes de traçabilité à la filière agroalimentaire, afin d'atteindre des objectifs de sûreté alimentaire.

IV.4.1. Définition

Le comité du Codex Alimentarius a défini et révisé la traçabilité des produits comme suit : « La traçabilité correspond à la capacité de suivre les déplacements d'un aliment parmi des stades précis de la production, de la transformation et de la distribution » (Comité du Codex Alimentarius « ALINORM 04/27/38 », 2004).

IV.4.2. Quels éléments devraient être tracés dans la chaîne alimentaire ?

Les systèmes de traçabilité visent à documenter l'histoire d'un produit le long de la chaîne de production depuis les matières premières jusqu'au produit final prêt à être consommé. Le champ d'application de ces systèmes n'est pas limité à la capacité de détecter et de suivre les lots de produits à haut risque, mais pour soutenir les processus d'assurance de la qualité des produits. La qualité est définie comme « l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites ». Par conséquent, dans le domaine de la sûreté alimentaire, la traçabilité peut être définie comme « la capacité de documenter tous les éléments pertinents, les mouvements, les processus, les contrôles nécessaires pour définir l'histoire de la vie d'un produit ».

IV.4.3. Les buts de la traçabilité dans la chaîne alimentaire

En ce sens, la traçabilité devient le principal outil à la fois pour assurer la responsabilité effective des fabricants de produits alimentaires, les agriculteurs et les

exploitants du secteur alimentaire en ce qui concerne la qualité du produit final (Raspor, 2002) et pour évaluer et gérer efficacement les risques. La traçabilité est une aide à la maîtrise de la qualité des aliments par rapport à une norme connue et de leur origine (Raspor, 2003). Si nous revenons à la définition des objectifs de la traçabilité des aliments, elle met en avant les points suivants :

1. Accroître la sécurité des produits
2. Identifier la source d'une contamination possible
3. Faciliter la procédure de rappel des produits
4. Maîtriser les risques de santé publique découlant de la consommation des produits.

IV.4.4. Législation

La traçabilité est aujourd'hui devenue la préoccupation constante et obligatoire (Règlement CE N° 178/2002) pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire. Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et résoudre les points critiques, respecter les réglementations, effectuer des autocontrôles (Règlement CE N° 2073/2005) ; les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène ; les consommateurs doivent être informés de la nature des produits.

Le Traité de Rome (1960) ne comporte que quelques dispositions sur la politique sociale, considérée alors comme un prolongement des mesures économiques. Il ne contient pas de dispositions pour les consommateurs. Jusqu'à 1972, pour la première fois le Conseil des ministres de la Communauté Économique Européenne (CEE) a discuté sur la nécessité de protection et d'information des consommateurs. Mais il faudra attendre l'Acte unique européen de 1986, ainsi que le Traité de Maastricht de 1992 pour que la Communauté

Européenne (CE) se fixe comme objectif, dans son article 153 (ex-article 129A) le principe suivant « Afin de promouvoir les intérêts des consommateurs et d'assurer un niveau élevé de protection des consommateurs, la Communauté contribue à la protection de la santé, de la sécurité et des intérêts économiques des consommateurs ainsi qu'à la promotion de leur droit à l'information, à l'éducation et à s'organiser afin de préserver leurs intérêts » (Ferrier, 1996).

La CEE a produit depuis 1993 une série de réglementations imposant aux producteurs de denrées alimentaires de mettre en place des mesures visant à assurer un niveau de protection élevée de la sécurité alimentaire du consommateur ; ces règlements CEE s'appliquent aujourd'hui à l'ensemble des pays membres et donc des pays exportateurs vers l'Union Européenne.

- En 1992, la Directive 1992/59/CEE du 29 juin 1992, ou Directive européenne pour la sécurité alimentaire générale spécifie que la sécurité de tous les produits doit être garantie. Disposer d'un système pour le retrait des produits en rayon des points de vente doit également être prévu. Ceci est aussi réglé dans la Directive 1992/59/CEE et implique une bonne traçabilité.

- En 1993, la directive CEE HYGIENE 93/43.

- En 2002, le règlement CE 178/2002 (article 18 sur la Traçabilité de la General Food Law ; règlement européen visant à standardiser la législation en matière de denrées alimentaires dans l'UE, s'appliquant à toutes les entreprises de la chaîne alimentaire y compris les producteurs d'aliments pour animaux mais à l'exception des cultivateurs de plantes. Entré en vigueur le 1 janvier 2005). L'article 18 exige la traçabilité des denrées alimentaires, des aliments pour animaux et de toute autre substance destinée à être incorporée ou susceptible d'être incorporée dans des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux, et ceci à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution. Les exploitants du

secteur alimentaire doivent être en mesure d'identifier toute personne leur ayant fourni une denrée alimentaire et d'identifier les entreprises auxquelles leurs produits ont été fournis. A cet effet, ces exploitants doivent disposer de systèmes et de procédures permettant de mettre l'information en question à la disposition des autorités compétentes, à la demande de celles-ci. Avec ce règlement, la traçabilité devient une obligation réglementaire qui s'ajoute à une autre obligation : celle de mettre sur le marché des denrées sûres.

- Au 1^{er} janvier 2006, la nouvelle réglementation européenne CEE 853/2004 sur l'hygiène et la sécurité des aliments, nommée en France le 'Paquet Hygiène', a remplacer l'ensemble des directives progressivement adoptées depuis 1964. D'autre part, elle concerne toute la filière alimentaire, de la fourche à la fourchette. Son objectif général est en effet de mettre en place une politique unique et transparente en matière d'hygiène applicable à toutes les denrées alimentaires et à tous les exploitants du secteur, y compris ceux de l'alimentation animale.

- A ce jour, la réglementation en vigueur dans l'Union Européenne impose la fourniture de certificats sanitaires qui doivent accompagner tous les produits alimentaires importés vers l'UE (Règlement CE N° 1831/2003). Un modèle de certificat sanitaire est établi pour chaque pays tiers (Thaïlande : 94/325/CE ; Malaisie : 96/608/CE ; Vietnam : 1998/813/CE ; Cameroun : 2001/634/CE). Ce document, qui est vérifié par la douane lors de chaque arrivage, comporte 4 grands chapitres : identification des produits, origine des produits, destination des produits et attestation sanitaire.

D'autre part, les recherches menées par de nombreux auteurs, permettent d'affirmer aujourd'hui que les produits vendus dans les marchés peuvent être classés en fonction de leur origine géographique, d'où la géotraçabilité.

IV.5. La géotraçabilité

IV.5.1. Définition

La géotraçabilité peut se définir comme le résultat de l'association de l'information géographique et des données traditionnelle utilisées dans les procédures de traçabilité. Dans le secteur agroalimentaire et plus particulièrement dans celui des productions végétales, la géotraçabilité s'intéresse aux relations existant entre une parcelle de production, sa localisation géographique, son environnement et les pratiques culturales. La géotraçabilité nécessitera la mise en œuvre de l'analyse spatiale et d'outils d'acquisition et de traitement de l'information qui seront associés dans des Systèmes d'Information Géographique (SIG) (GeoTraceAgri, 2005).

IV.5.2. Objectifs

- ✓ Les objectifs tels qu'ils ont été définis dans le cadre du projet européen GeoTraceAgri (GTA) concernent principalement la traçabilité amont (Figure 8 et 9) ;
- ✓ Promotion de la qualité et de l'origine des productions ;
- ✓ Valorisation des pratiques agricoles définies à partir de spécifications écrites (cahier des charges) imposées et certifiées par les acteurs du secteur dans chaque pays ;
- ✓ Une meilleure gestion des risques en matière de qualité et de sûreté alimentaire (impact sur l'environnement du produit, respect des spécifications écrites).



Figure 8: Les objectifs de création de valeur ajoutée pour les producteurs et fabricants d'aliments (Source : GeoTraceAgri, 2005)

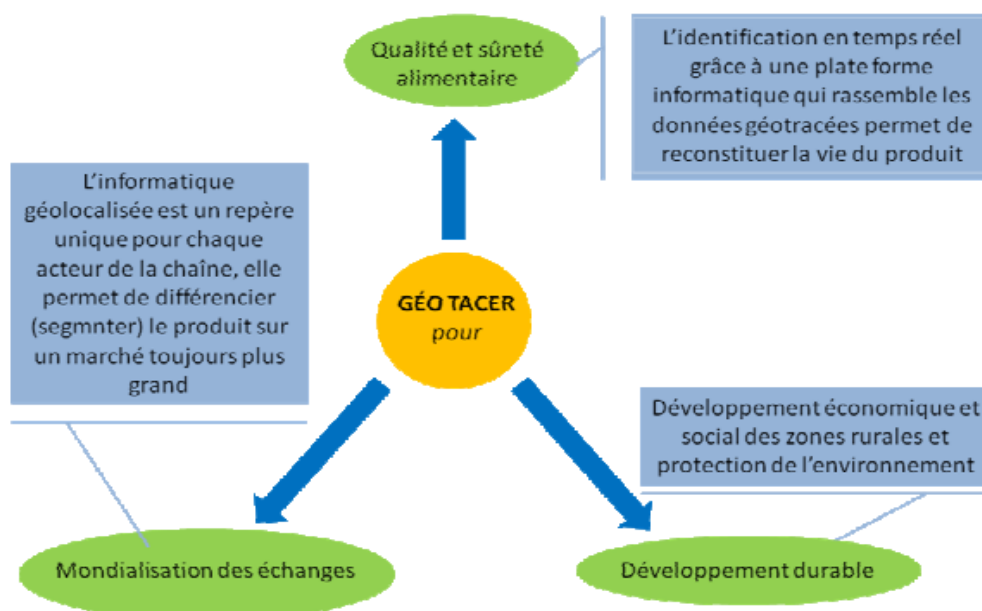


Figure 9: Les enjeux stratégiques couverts par le géotraçabilité (Source : GeoTraceAgri, 2005)

IV.6. Biomarqueurs

La traçabilité ne peut être résolue sans identification de marqueurs d'origine géographique. Des travaux ont été menés dans le but d'étudier les marqueurs d'origine biologique communément appelés biomarqueurs. El Sheikha *et al.* (2010_b) ont montré que les biomarqueurs sont en effet liés aux régions de production et aux systèmes de production des aliments. De plus, ils sont liés directement à la sûreté des denrées alimentaires au cours de leur production ou de leur consommation.

IV.6.1. Définitions des biomarqueurs

Il existe de nombreuses définitions des biomarqueurs :

- Une réponse biologique à un produit chimique issu de l'environnement (Walter *et al.*, 2001);
- Un caractère biochimique, physiologique ou histologique qui change ou une aberration dans un organisme qui peut être utilisé pour estimer l'exposition aux produits chimiques ou les effets qui en résultent (Hugge *et al.*, 1992);
- Un changement dans une réaction biologique qui peut être lié à une exposition ou à un effet toxique d'un produit chimique de l'environnement (Peakall, 1999);
- Des mesures fonctionnelles liées à l'exposition à des stress environnementaux, qui sont généralement exprimés au niveau sub-organismal (Adams, 2002);
- En médecine et pharmacie, il existe également de nombreuses définitions, comme «une mesure pharmacologique ou physiologique qui est utilisée pour prédire un événement toxique chez un animal» ou «un caractère biochimique spécifique dans le corps, qui a une

caractéristique moléculaire particulière qui le rend utile pour mesurer les progrès de la maladie ou les effets du traitement» (<http://www.hyperdictionary.com/medical/biomarkers>).

IV.6.2. Intérêts des biomarqueurs

L'idée d'utiliser des biomarqueurs d'exposition est qu'ils pourraient fournir, dans certains cas, une méthode plus précise pour évaluer l'exposition et, en définitive, le risque (Schulte et Waters, 1999). Bien que l'utilisation de biomarqueurs puisse réduire les erreurs de classification, il est également possible que l'erreur de mesure, pour un biomarqueur particulier, puisse induire une erreur sur l'origine du produit (White, 1997; Saracci, 1997). Cependant, de bonnes pratiques de laboratoire peuvent réduire ce problème au minimum. La validité des marqueurs biologiques est la force de conduite ultime de leur applicabilité (Raspor, 2004).

Les pratiques actuelles d'élaboration de nouveaux aliments obligent les décideurs publics à développer de nouveaux systèmes analytiques rapides et peu coûteux. Leur développement serait un bénéfice énorme pour l'industrie alimentaire moderne et pour la santé des consommateurs. Des identificateurs primaires de produits alimentaires, basés sur des marqueurs biologiques, pourraient être des facteurs anatomiques, physiologiques, biochimiques, ou des paramètres moléculaires qui permettraient d'assurer une traçabilité complète tout au long de la chaîne alimentaire.

IV.6.3. Techniques mettant en œuvre l'ADN

Jusqu'à présent, l'identification biologique des individus était basée sur des caractères non visibles de l'expression de gènes identifiables (typage des groupes sanguins, analyse du profil électrophorétique de certaines protéines ou enzymes) dont la transmission au cours des

génération peut être facilement analysée. Néanmoins, ces marqueurs phénotypiques sont souvent peu polymorphes et, dans les populations dont le taux de consanguinité est plus ou moins élevé, ils peuvent se montrer inadéquats pour les tests d'identité ou de parenté. Par ailleurs, ils ne peuvent être mis en évidence qu'à partir de tissus dans lesquels ils sont exprimés, et généralement à partir d'échantillons fraîchement récoltés.

En raison de la dégénérescence du code génétique (à un acide aminé correspondent plusieurs codons), le polymorphisme présent au niveau de l'ADN constituant les gènes est toujours plus élevé que celui observable au niveau du produit des gènes (les protéines). C'est pourquoi la méthode d'empreintes génétiques est basée sur la mise en évidence des polymorphismes au niveau de l'ADN. Cet ADN, source des marqueurs génotypiques, constitue donc le meilleur matériel d'étude pour différencier les êtres vivants (Portetelle *et al.*, 2000).

Les techniques de génétique moléculaire offrent des perspectives d'identification et de traçabilité des individus et de leurs produits sous forme d'« empreintes génétiques » (DNA fingerprinting). L'analyse des microsatellites de l'ADN permet d'obtenir une empreinte génétique fournissant une information quasi infaillible quant à l'identité et la parenté des individus. Les microsatellites sont des séquences courtes répétées en tandem et caractérisées par un grand nombre d'allèles (une dizaine) qui diffèrent par le nombre des répétitions. Cette information peut être obtenue à partir de très peu de matériel biologique. Cette méthode s'avère être à l'heure actuelle une méthode fiable, pratique, de coût raisonnable pour identifier et certifier les produits alimentaires transformés ou non. Elle peut être appliquée dans certains cas où les aliments sont génétiquement adaptés à leur environnement (cas du poisson) et à l'authentification de l'origine (China *et al.*, 2004).

Dans leurs travaux sur l'étude de la dynamique des populations microbiennes, certains auteurs (Lessing, 2005 ; El Sheika et Montet 2010 ; Maïworé, 2010) ont montré que le profil microbien peut être utilisé comme outil de traçabilité, car il est généralement associé à l'origine géographique des produits.

IV.6.4. Profil microbiologique

Les méthodes qui emploient l'analyse globale de la flore microbienne sont basées sur le principe que l'environnement a un effet sur la communauté microbienne de l'aliment et que cette communauté serait retrouvée conservée dans l'aliment. Lessing (2005), Maïworé (2010), ont montré dans leurs travaux que, les populations bactériennes présente dans les poissons pourraient constituer des « marqueurs microbiologiques » permettant d'identifier l'origine des produits alimentaires dérivés de ces derniers en utilisant la diversité ou les communautés microbiennes présentes dans les poissons.

Généralement, le but de l'analyse microbiologique des produits alimentaires est d'évaluer la présence possible de bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences sur la santé du consommateur et de donner une idée de la qualité hygiénique des aliments en relation avec l'application des bonnes pratiques de fabrication comme le respect de la chaîne du froid, l'hygiène des personnels et des équipements au cours de la manutention et des procédés de fabrication (Huss, 1999). Pour établir la traçabilité du café, les analyses microbiologiques à mettre en œuvre doivent permettre de dresser un inventaire aussi fidèle que possible des microorganismes présents sur les cerises de café, pour relier leur relative composition à une identification d'origine.

IV.7. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne

IV.7.1. Méthodes de microbiologie traditionnelles

Les méthodes classiques de microbiologie nécessitent le plus souvent de disposer de souches pures vivantes et cultivables. Les différentes souches microbiennes sont isolées et purifiées sur des milieux de culture plus ou moins sélectifs dans des conditions d'oxygénation, de temps et de température, ou des additifs présents peuvent parfois limiter la croissance de certaines souches au détriment des autres. Pour des populations microbiennes assez homogènes qui ne comportent pas trop d'individus voire d'espèces ou de genre différents, ces méthodes donnent de bons résultats. Cependant, quand la diversité des flores augmente, il devient difficile d'isoler et de purifier tous les microorganismes présents dans un échantillon. Cette difficulté est d'autant plus importante que la part des souches anaérobies strictes est plus grande. Il n'existe pas de milieux et de conditions de culture universels permettant d'isoler la majorité des souches viables cultivables d'un échantillon intégrant l'anaérobiose et l'aérobiose.

Pour l'identification des microorganismes, les critères utilisés peuvent être morphologiques (macroscopique ou microscopique), biochimiques, sérologiques, lysotypiques ou génétiques en fonction de la finesse de l'identification recherchée.

Ces techniques d'analyse de la diversité microbiologique présentent l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte ou une approximation grossière de la diversité naturelle. Ces problèmes sont connus depuis longtemps et ont été décrits sous le terme de « la grande anomalie du comptage sur boîte » (Staley et Konopka, 1985 ; Brock, 1987). Selon ces auteurs, entre 0,001 et 15% des bactéries présentes dans un échantillon sont cultivables à l'aide des techniques classiques ; ce décalage est à attribuer à différentes causes (Amann *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1998) :

- Le milieu de culture choisi ne peut être universel et l'ensemble des conditions environnementales ne peuvent être reproduites sur un seul et même milieu de culture en particulier pour l'environnement à forts gradients physico-chimiques.

- Certaines cellules hors de leur environnement peuvent être dans un état viable mais non cultivable. Cet état cellulaire correspond à une adaptation aux conditions de stress, notamment nutritionnel. Il s'accompagne de modifications physiologiques et structurales dont le rétablissement n'est pas simplement possible sur le milieu synthétique. Cet état peut être maintenu de plusieurs jours à plusieurs années.

- Des populations inférieures numériquement peuvent supplanter des populations majoritaires moins adaptées au milieu de culture.

- Des populations cultivées en milieu liquide peuvent ne pas se développer sur milieu solide.

- Des microorganismes différents ayant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables.

- Certaines cellules sont impossibles à obtenir en culture pure comme c'est le cas des microorganismes symbiotes et syntrophes.

C'est pour ces raisons que des méthodes appelées de culture indépendante ont été développées afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité des populations microbiennes complexes.

IV.7.2. Méthode d'analyse des flores microbiennes par culture-indépendante

Durant la dernière décennie, l'analyse de la composition de la communauté microbienne a évolué considérablement. Des approches de culture-indépendante ont été développées grâce aux progrès en biologie moléculaire. Les méthodes moléculaires se caractérisent par leur rapidité et leur fiabilité. Ces techniques peuvent fournir un profil représentant la diversité génétique d'une communauté microbienne d'un environnement spécifique. La fonction écologique et la biodiversité des levures sont relativement peu connues par rapport à celles des autres micro-organismes (Herrera et Pozo, 2010). Pour les moisissures, ce manque d'information de base sur la diversité a des implications importantes pour de nombreux aspects de la biologie évolutive, par exemple, les hypothèses phylogénétiques, le rôle que joue la biodiversité face aux perturbations, les relations et les processus de coévolution, l'interprétation des modèles biogéographiques, des programmes de dépistage, etc (Mueller et Bills, 2004; Hawksworth et Mueller, 2005). L'identification des levures et des moisissures basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARN 26S et 28S ribosomiaux est devenue un outil très performant pour étudier les communautés des levures et moisissures dans les échantillons environnementaux (Cocolin *et al.*, 2002a ; Hesham *et al.*, 2006 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008).

IV.8. Les acides nucléiques et les techniques de biologie moléculaire utilisées en communauté microbienne

IV.8.1. Le développement des techniques moléculaires

L'émergence des techniques moléculaires en communauté microbienne est liée au développement de la phylogénie moléculaire à la fin des années soixante (Zuckerland et

Pauling, 1965). A la fin des années quatre-vingt, l'ARN ribosomique (ARNr) a été choisi comme marqueur évolutif et pour évaluer les relations phylogénétiques des divers organismes tels que les procaryotes et les eucaryotes (Woese, 1987). Les premières études de communauté microbienne par biologie moléculaire proviennent de Bruns *et al.* (1989) et Guého *et al.* (1990), qui ont comparé les séquences des ARNr pour établir les liens phylogénétiques entre les espèces d'un écosystème de levures et d'un écosystème de moisissures.

IV.8.2. Les techniques moléculaires dites d'« empreinte génétique »

Ces techniques permettent de comparer plus facilement des échantillons et d'évaluer rapidement la diversité microbienne d'un écosystème. La détection des séquences de l'ADNr 26/28S est une empreinte de la présence des microorganismes. Elle ne renseigne pas sur la viabilité des cellules ni sur leur activité métabolique. L'ADN de cellules mortes peut persister temporairement dans l'environnement et de nombreuses cellules peuvent se trouver dans un état de dormance. Le contenu en ARNr des cellules d'une population donnée est corrélé au taux de croissance de ces cellules et réagit rapidement aux variations des conditions environnementales (Ward *et al.*, 1990). Cependant, la sensibilité des molécules d'ARNr à la dégradation par les RNases rend l'isolement et la manipulation des molécules d'ARN plus délicats que pour les molécules d'ADN (Von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Le choix de la grande sous-unité de l'ARNr (26/28S) peut être expliqué par plusieurs raisons (Hassouna *et al.*, 1984 ; Hancock *et al.*, 1988 ; Kurtzman et Robnett, 1998 ; Seifert, 2009 ; Khot *et al.*, 2009) :

- Sa présence est universelle et il y accomplit le même rôle chez tous les organismes.

- Il a une structure bien conservée car toutes modifications pourraient avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés.
- La grande sous-unité de l'ARNr (26/28S) est particulièrement appropriée pour étudier la relation entre la séquence primaire et structure secondaire parce que leurs structures sont beaucoup plus variables que ceux de la petite sous-unité de l'ARNr.
- Il est relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules.
- Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.
- Sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standards d'extraction et de séquençage.

Actuellement, le gène codant pour l'ARNr 26/28S est un des marqueurs d'espèce le plus utilisé. Il est en effet possible de définir des amorces universelles pour son amplification (Cocolin *et al.*, 2002a ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008 ; El Sheikha *et al.*, 2010). Le travail d'identification initiale phylogénétique et moléculaire sur les eucaryotes a commencé avec des gènes ribosomiques nucléaires. La grande sous-unité LSU qui est dénommée 26S pour les levures ou 28S pour les moisissures possède deux sous-régions variables appelées D1 et D2 qui sont beaucoup plus variables que celles des petites unités de l'ARNr (Figure I.11).

Les méthodes d'identification traditionnelles qui sont basées sur des essais laborieux et physiologiques échouent souvent pour la détermination des espèces. Afin d'étudier les

structures et la dynamique de la population, les techniques d'empreintes génétiques sont nécessaires (Muyzer, 1999). Ces dernières années plusieurs techniques moléculaires d'analyses de fragments d'ADN sont utilisées avec succès sur les espèces des champignons (Barszczewski et Robak, 2004; Pina *et al.*, 2005). Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN de l'écosystème. Le mélange de fragments de produit de PCR est ensuite analysé par diverses techniques d'électrophorèse soit par les méthodes basées sur l'analyse de la taille des fragments (RAPD, ARDRA, RFLP, AFLP), soit par les méthodes basées sur la séquence nucléotidique des fragments (SSCP, TGGE/DGGE, DHPLC).

La RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) est un des outils de typage moléculaire couramment utilisé. Les ADN étudiés sont hydrolysés par une ou plusieurs enzymes de restriction pour donner des fragments de tailles différentes. Le polymorphisme des séquences d'ADN conduit à l'existence de site de coupure spécifique plus ou moins éloignés et engendre la production de fragments différents d'ADN en nombre et en taille, ce qui est révélé après électrophorèse en gel d'agarose. Un autre outil, la SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) qui analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide la conformation en simple brin, après dénaturation et renaturation en boucle des simples brins de fragments d'ADN amplifié. Enfin la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) partent du principe que les variations de séquence de fragment étudiées entraînent des variations des propriétés de fusion (T_m) de la séquence d'ADN double brin considérée (Muyzer *et al.*, 1996). Ces deux techniques permettent l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, permettant de suivre l'évolution de la communauté au fil du temps et l'espace (Muyzer, 1999 ; Nicolaisen et Ramsing, 2002).

IV.9. La méthode de PCR-DGGE

IV.9.1. Principe de la PCR-DGGE

Le principe de la DGGE est basé sur la séparation partielle d'un fragment d'ADN double-brin sous l'action d'un dénaturant (Fischer et Lerman, 1983). La DGGE permet de séparer des fragments d'ADN de taille identique mais avec des séquences différentes. La séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire croissant d'agents dénaturants (urée et formamide). L'électrophorèse est effectuée à une température constante entre 55 et 65°C, la plupart du temps à 60°C. Cependant, si le gradient augmente de façon linéaire, la dénaturation de l'ADN ne se fait pas de façon progressive tout au long de la molécule, mais de domaine en domaine. La séparation des doubles brins se fait plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT (Adénine-Thymine, deux doubles liaisons) et GC (Guanine-Cytosine, trois doubles liaisons). La conformation spatiale du fragment d'ADN se modifie parallèlement à l'importance des domaines dénaturés ce qui limite sa mobilité électrophorétique (Muyzer *et al.*, 1996). Une résolution optimale est obtenue quand les fragments ne sont pas totalement dénaturés. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (très riche en GC) est associée lors de l'amplification (Figure 10). La PCR est alors réalisée avec l'amorce forward portant en 5' une séquence de 40 GC : le GC clamp (Sheffield *et al.*, 1989, El Sheikha *et al.*, 2010).

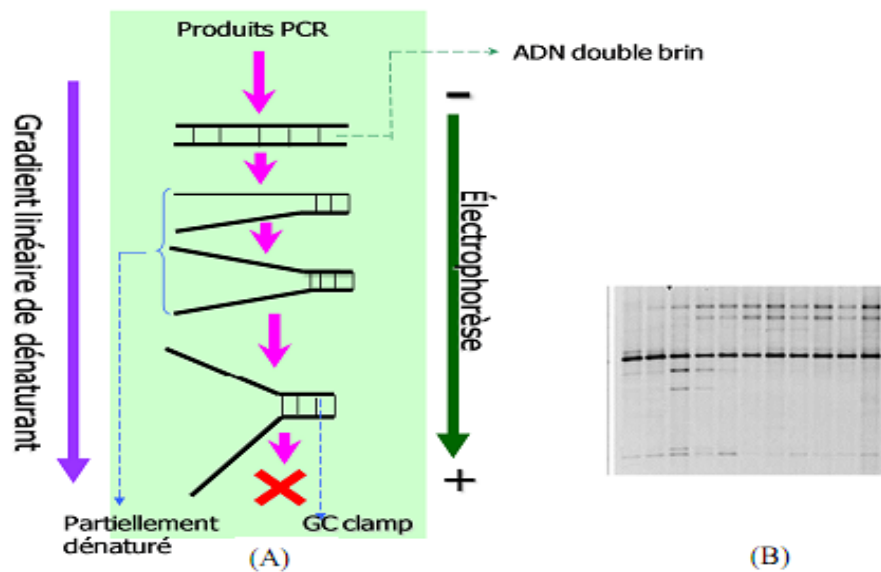


Figure 10: Représentation schématique de la méthode PCR-DGGE : (A) : comportement d'un produit de PCR lors de la DGGE, (B) : photo d'un gel DGGE après coloration au bromure d'éthidium

La technique de PCR-DGGE est un outil moléculaire bien établi en microbiologie de l'environnement qui permet l'étude de la complexité et le comportement des communautés microbiennes. La technique est fiable, reproductible, rapide, peu coûteuse et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en une seule étape. La DGGE est très appliquée à l'étude de la diversité microbienne de plus, elle peut être couplée à des techniques de clonage et de séquençage ultérieures (Muyzer *et al.*, 1993). La totalité des microorganismes sont tout d'abord extraits de l'échantillon puis les ADN sont extraits des microorganismes en une seule étape pour obtenir un mélange contenant l'ADN total des flores microbiennes présentes dans l'échantillon. Ensuite, l'ADN total est utilisé comme cible d'amplification par PCR des régions d'intérêt. Les produits amplifiés obtenus sont composés d'un mélange des amplicons des flores microbiennes de l'échantillon initial. Tous les amplicons ont la même taille mais leurs séquences sont différentes, par conséquent ils peuvent être séparés par la DGGE (Figure 11).

Le résultat final est une empreinte génétique spécifique des espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. Le profil électrophorétique présente une série de bandes spécifiques de la population microbienne de l'échantillon analysé dont on considère que chaque bande représente un microorganisme (Muyzer *et al.*, 1993, Ercolini, 2004).

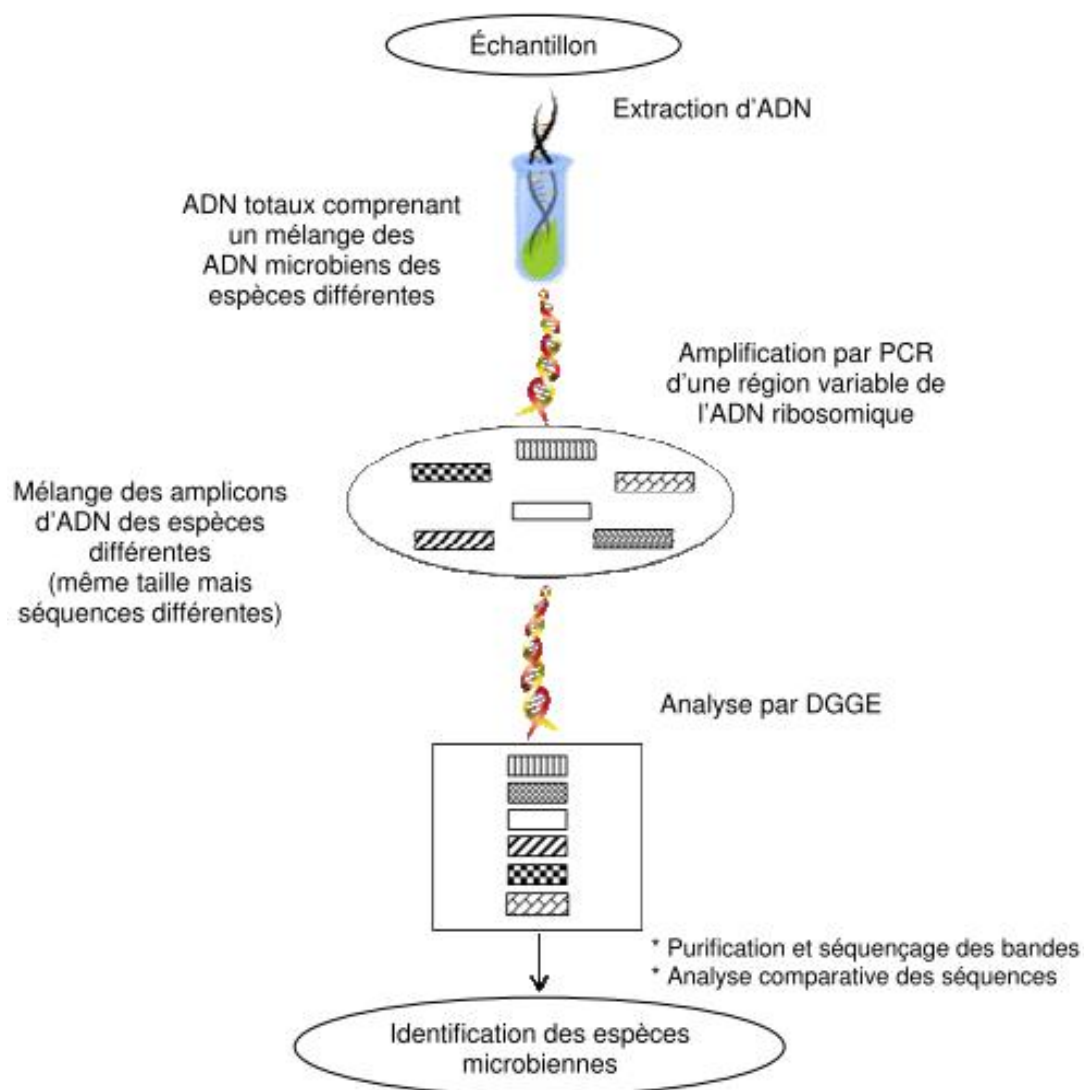


Figure 11 : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires (Ercolini, 2004)

IV.9.2. Les applications de la PCR-DGGE

IV.9.2.1. Étude de la biodiversité de la communauté microbienne dans

l'environnement

Depuis son introduction par Muyzer *et al.* (1993) en communauté microbienne, la PCR-DGGE a été employée avec succès pour étudier les communautés microbiennes dans l'environnement. Cette technique est habituellement employée pour évaluer la diversité de la communauté et pour déterminer sa dynamique en réponse aux variations environnementales. Peu d'études ont utilisé cette technique pour caractériser la diversité des eucaryotes. Les plus récentes applications portent sur l'étude de la structure et de l'évolution des communautés des champignons de l'environnement (López-Archilla *et al.*, 2001 ; Aguilera *et al.*, 2006) ; du sol (Van Elsas *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2008) ; de l'aérosol (Nieguitsila *et al.*, 2007) ; des fruits frais (El Sheikha *et al.*, 2009; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010) ; de rhizosphère du blé (Smit *et al.*, 1999 ; Gomes *et al.*, 2003) ; du compost (Marshall *et al.*, 2003) ; des boues (Maila *et al.*, 2006) ; des picoeucaryotes marins (Díez *et al.*, 2001a,b) ; des rivières (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Amaral Zettler *et al.*, 2002) ; du bois (Vainio et Hantula, 2000).

IV.9.2.2. Contrôle de la qualité des produits alimentaires

La PCR-DGGE peut être appliquée, en tenant compte de ses limites de sensibilité, à la détermination des flores des champignons dans un produit fini, et ainsi permettre de contrôler sa qualité microbiologique. Ainsi, Cocolin *et al.* (2004) ont utilisé la PCR-DGGE, la RT-PCR-DGGE et l'hybridation pour la surveillance de la détérioration des vins par des champignons et ont proposé de détecter la présence de *Brettanomyces bruxellensis* comme test de confirmation de détérioration des vins.

Nielsen *et al.* (2005) l'ont utilisé pour caractériser les populations levuriennes présentes dans le cacao fermenté ghanéen sur trois sites différents à des périodes différentes au cours de la saison de production. Ils ont montré que la PCR-DGGE semble être une méthode efficace et relativement bon marché pour examiner la composition microbienne de la fermentation du cacao, offrant ainsi la possibilité d'examiner un certain nombre d'échantillons dans un temps relativement court. En outre, une meilleure compréhension de la dynamique microbienne au cours de la fermentation du cacao est une étape importante vers l'élaboration de mesures de gestion de qualité pour la production de cacao de haute qualité.

Dans la même optique, Laforgue *et al.* (2009) ont ainsi montré que la PCR-DGGE a permis de suivre la dynamique des communautés fongiques présentes sur les raisins pour une détection précoce des espèces potentiellement impliquées dans les défauts du vin. À cette fin, ils ont constitué une collection de référence de levures et espèces de moisissures isolées à partir de raisins (Sage *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2005), incluant les espèces responsables des défauts du vin. Ils ont conclu que la PCR-DGGE représente un outil utile pour établir le profil des communautés fongiques, mais ne convient pas directement pour décrire avec précision les espèces présentes. Des études complémentaires devront ainsi être réalisées sur les cultures complexes pour une meilleure connaissance des communautés fongiques sur les raisins, en particulier des espèces responsables des défauts du vin. Lorsque ces espèces seront connues, il sera également intéressant de concevoir des méthodes plus spécifiques pour les détecter.

IV.9.3. Les limites de la PCR-DGGE

Comme toutes les techniques moléculaires, la PCR-DGGE est elle aussi soumise à de nombreux biais qui peuvent forcément entacher l'analyse de la diversité microbienne d'un échantillon. Ces biais peuvent intervenir à différents stades de l'analyse : lors de l'échantillonnage, de la conservation de l'échantillon, de la lyse cellulaire lors de l'extraction

des ADN, de l'amplification de l'ADNr 26S/28S par PCR, de la migration électrophorétique sur le gel DGGE et du manque de sensibilité de la méthode pour les souches présentes en faible quantité.

L'étape d'extraction d'ADN peut conditionner à elle seule l'efficacité de la séparation. La purification des acides nucléiques peut s'avérer être difficile lorsque l'aliment n'est pas homogène. La présence des lipides, des protéines, et des polysaccharides diminue les rendements d'extraction, mais ces molécules peuvent également agir comme inhibiteurs lors de la réaction de PCR (Wilson, 1997). De plus, toutes les espèces microbiennes n'ont pas la même sensibilité aux agents chimiques lytiques du fait de l'organisation différente de leur paroi. L'image obtenue est de ce fait biaisée. Il est donc indispensable d'optimiser au mieux le protocole d'extraction, afin d'en augmenter le rendement, pour chaque nouvelle matrice à étudier.

La PCR peut être elle-même limitante. Les choix du couple d'amorces et surtout de la région hypervariable à amplifier sont déterminants. Pour un même échantillon, l'image de la population bactérienne peut varier en fonction de la région de l'ADNr amplifiée (Ercolini *et al.*, 2003a).

Autre difficulté, la résolution des gels DGGE permet une séparation de fragments ayant une longueur maximale de 500 paires de bases. Des phénomènes de comigration peuvent apparaître. Malgré des séquences différentes, les propriétés de fusion des brins d'ADN peuvent être identiques et donner des bandes identiques.

Enfin, différentes études sur des produits alimentaires (Dewettinck *et al.*, 2001 ; Ogier *et al.*, 2002 ; Fazoli *et al.*, 2003 ; Temmerman *et al.*, 2003) ont permis de définir les limites de détection de cette méthode d'empreinte génétique. Les seuils de détection sont dépendants des espèces considérées, et sont compris entre 10^4 et 10^8 UFC/mL. Ces limites sont également

fonction de la complexité de la population étudiée dans la matrice alimentaire. Des compétitions notamment lors de l'amplification peuvent être à l'origine de la fluctuation des seuils de détection.

Dans le monde, il est important d'avoir une base de données sur le profil microbien des aliments pour assurer la traçabilité. Le Cameroun qui est un pays en train de relancer sa filière cacao/café (pleine expansion de sa production), devrait avoir une production qui répond aux normes de qualité définies par l'UE, car c'est la destination majeure de ses exportations. Pour cela il devrait se soumettre aux exigences de ce marché, ce qui constituerait un moyen non négligeable de lutte contre la pauvreté. La PCR-DGGE apparaît donc ici comme un outil efficace pour analyser la totalité des flores fongiques toxigènes présentes sur le café Camerounais destiné à la consommation et à l'exportation.

Le choix porté sur l'étude des champignons (caractérisation par les techniques culturales, PCR-DGGE et séquençage), dans le cadre de cette étude a été motivé par le fait que ceux-ci peuvent résister à des conditions plus extrêmes que les bactéries (Ros Chumillas *et al.*, 2007) et ont un plus faible taux de mutation par rapport aux bactéries et aux virus (Drake *et al.*, 1998). Les champignons sont donc des marqueurs environnementaux potentiellement meilleurs que les bactéries. De plus, ces derniers sont capables de synthétiser les mycotoxines qui à l'heure actuelle posent un véritable problème de santé publique et connaissent des surveillances régulières dans les marchés internationaux.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1.Le Café

Les grains de café (*Coffea arabica* et *coffea robusta*) ont été récoltés pendant les campagnes caféières de 2009 et 2010 dans les régions de l'Ouest (Bafoussam, Dschang, Bafang, Santchou) et dans la plaine du Littoral (Melong) au Cameroun (Figure 12). Ces régions fournissent plus de 75 % de la production nationale, soit en moyenne 80 000 tonnes de café marchand par an. Le climat est de type équatorial avec une pluviosité d'environ 3000 mm/an. Le type de café « robusta » est le plus rencontré. La cueillette est faite à la main afin d'avoir selon le cas des graines saines et bien mûres ou ayant les caractéristiques désirées.

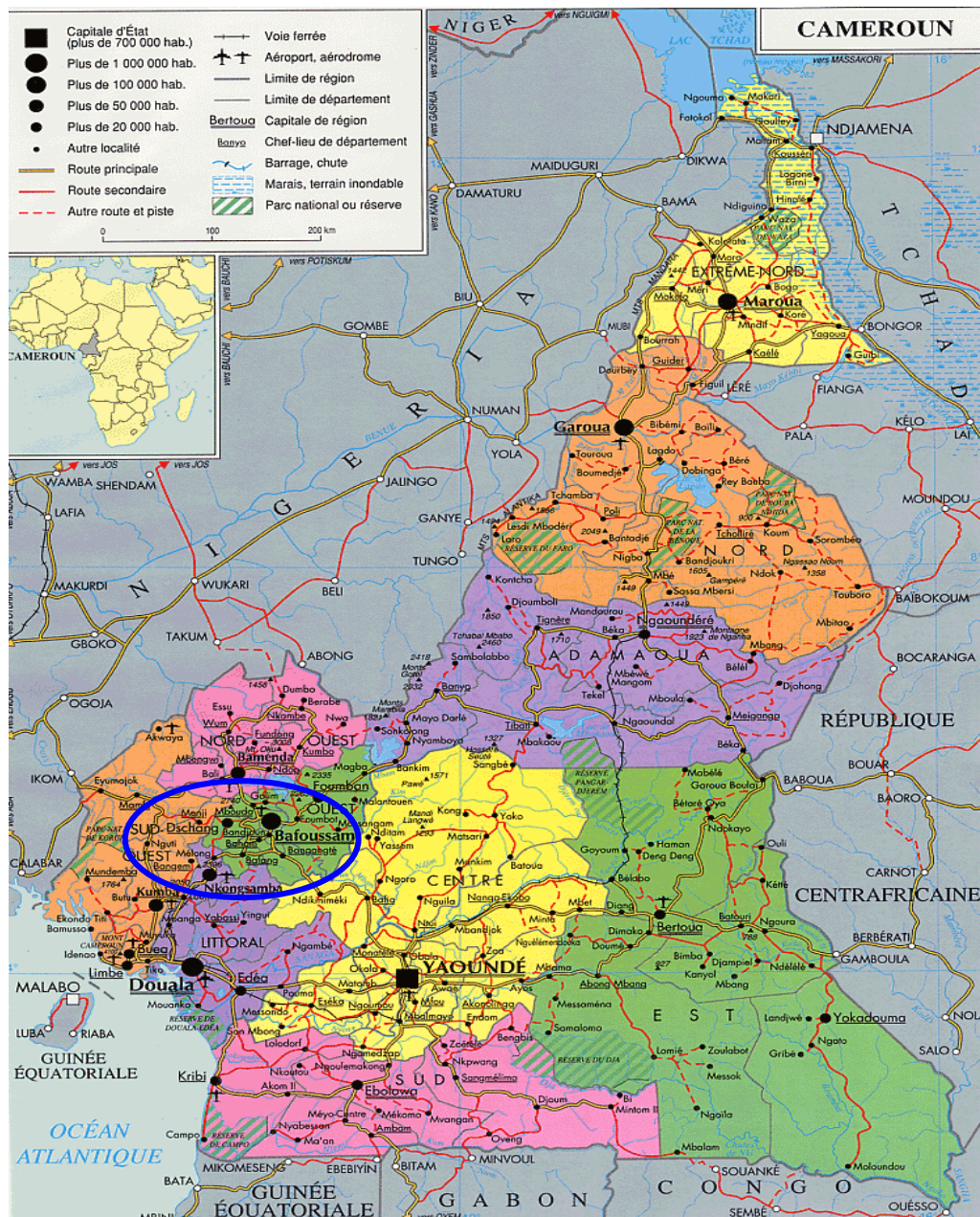


Figure 12: Localisation de la zone d'étude : plaine du Littoral et Ouest du Cameroun

http://www.afrique.planete.com/cameroun/carte_cameroun.htm



Figure 13: Carte de l'Ouest du Cameroun représentant les sites de collecte du café
(Champaud, 1972).

Tableau 4 : Données environnementales des sites de collecte du café

Sites	année	Période de collecte	Altitude	Température	Précipitation	Hygrométrie
Bafang	2009	D	1171	21,23	9,43	91
		M		23,13	9,29	83
		F		23,31	11,33	82
Bafoussam		D	1397	20,43	9,51	85
		M		20,05	8,05	80
		F		21,28	10,09	83
Dschang		D	1385	20,65	10,02	90
		M		20,35	8,47	82
		F		21,62	10,57	85
Santchou		D	720	23,44	14,17	92
		M		23,88	12,23	86
		F		25,64	13,51	88
Melong		D	840	23,56	13,45	92
		M		23,37	11,37	85
		F		26	12,73	87
Bafang	2010	D	1171	21,33	11,59	91
		M		21,44	9,31	84
		F		23,51	11,29	83
Bafoussam		D	1397	20,63	9,61	87
		M		20,12	8,17	81
		F		21,48	10,03	84
Dschang		D	1385	20,85	10,01	90
		M		20,45	8,33	83
		F		21,87	10,01	86
Santchou		D	720	23,54	14,01	94
		M		24,02	12,19	87
		F		25,94	13,55	89
Melong		D	840	23,65	13,25	92
		M		23,86	11,37	86
		F		26,04	12,87	88

Source : direction nationale de la métrologie de Douala/Cameroun ; D : Début de campagne M : Mi-campagne ; F : Fin de campagne

Les conditions climatiques des zones de récolte au Cameroun

Le Cameroun présente des climats intertropicaux variés qui se succèdent, allant du climat équatorial humide près de l'Océan Atlantique, au climat tropical sahélien dans les régions du Lac Tchad.

Le climat équatorial a quatre saisons bien marquées (deux saisons sèches alternant avec deux saisons humides d'inégale intensité) couvrant tout le Sud du pays. Il est caractérisé par des précipitations qui varient de 1500 à 2000 mm. La température moyenne annuelle est de l'ordre de 25°C et l'amplitude moyenne annuelle est de 2,4°. Le climat équatorial type côtier Sud a quatre saisons beaucoup plus humides par suite des précipitations très abondantes.

Le climat équatorial de type côtier à deux saisons seulement. Il caractérise les régions du Littoral et du Sud-ouest. Les précipitations abondantes varient ici de 2000 à 10000 mm. La température moyenne annuelle est de 26°C et l'amplitude annuelle de 2,8°. Elle tombe parfois à 21°C avec une amplitude de 2,2°.

Le climat tropical soudanien de montagne de l'Ouest à deux saisons (de Dschang à Foumban et de Bamenda à Nkambe). Une saison sèche qui va de novembre-décembre à mai-juin, une saison des pluies qui commence en juin-juillet jusqu'en novembre-décembre. Les températures oscillent entre 18°C et 30°C en moyenne avec une forte variation journalière : la température moyenne est de 25°C.

I.2. Souches fongiques

Tableau 5: Souches de moisissures utilisées dans cette étude

Moissures	Souches	Origine
<i>Penicillium roqueforti</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus tubigenis</i>	CBS 161.79	CBS
<i>Mucor racemosus</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus ochraceus</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus carbonarius</i>		UMR95 Qualisud, UM 2
<i>Aspergillus niger</i>	CET 2091	UMR95 Qualisud, UM 2

* CBS: Centraal Bureau voor Schimmelculture

II. METHODES

II.1. Echantillonnage

Dans cette étude, trois types de grains de café Arabica : Parche, café vert et cerises sèches, ont été collectés dans deux coopératives (CAPLAMI et CAPLAME) de l'ouest (Bafoussam et Dschang) ; Deux autres types de grain de café Robusta : Cerises sèches et café vert, ont été collectés dans cinq fermes de l'ouest et de la plaine côtière (Bafoussam, Dschang, Santchou, Melong et Bafang). Au total 104 échantillons de café (42 Arabica et 62 Robusta) ont été collectés durant les campagnes caféières de 2009 et 2010. Le prélèvement des échantillons s'est fait auprès des producteurs (coopératives, fermes) tous les trois mois pendant deux ans, ceci à différentes étapes de la transformation (Figure 14). Il s'agit du café en parche sec (I_a), des cerises séchées (I_b) et des grains de café vert (II). Deux types traitements post-récolte sont appliqué sur le café: le traitement par voie humide pour le café arabica (cerise bien mûres) et le traitement par voie sèche pour le café Robusta et Arabica (cerises immatures ou abimées). 500 g d'échantillon de café ont été prélevés dans des sacs de 50 kg (100g à 5 endroits différents du sac de café). Ces derniers ont ensuite été introduits dans des sacs plastiques stériles et transportés au laboratoire pour analyses.

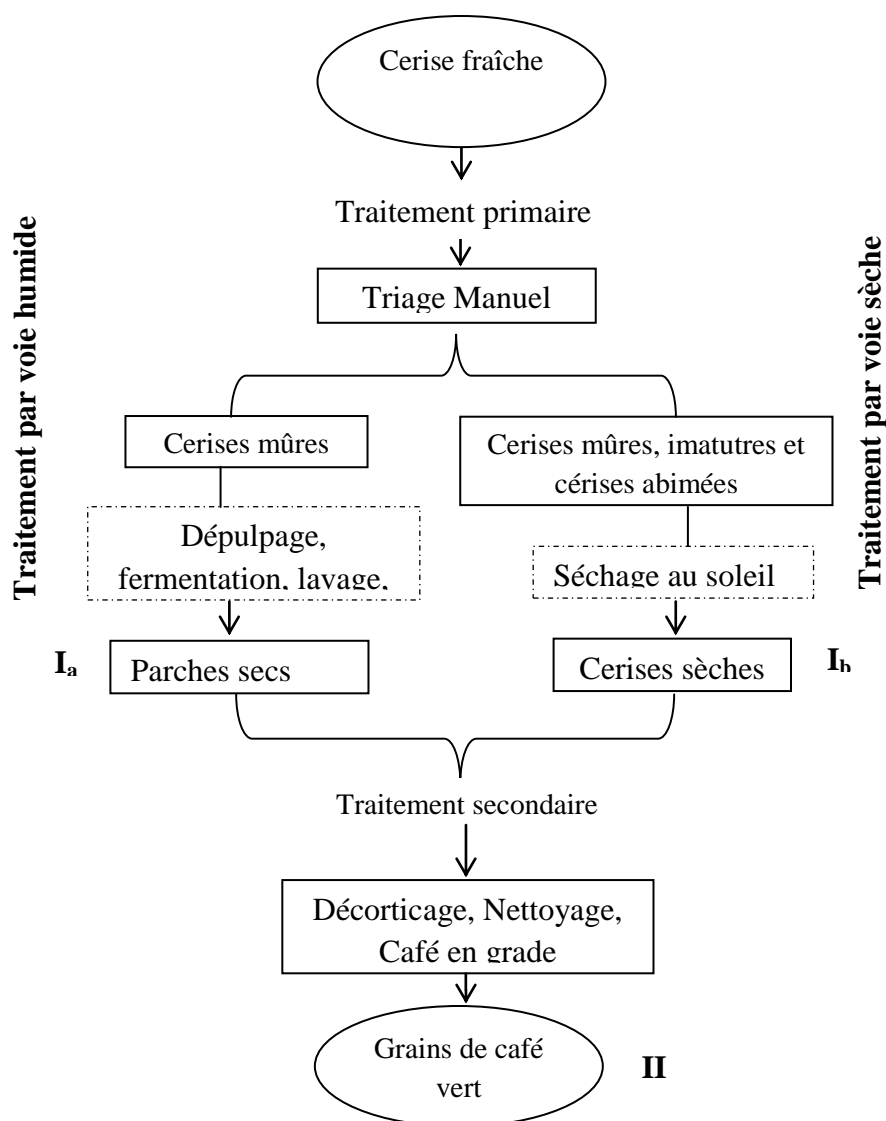


Figure 14. Étapes de traitement et de transformation du café, des cerises fraîches aux grains de café au Cameroun. **I_a**, **I_b**, **II** : Stades de prélèvement

II.2. Dosage de l'OTA dans le café

II.2.1. Extraction de l'OTA

Les échantillons de café sec ont été congelés à -80°C puis ont été broyés (broyeur Perten Laboratory Mill 3600). 10g de fèves broyées ont été introduit dans un "mixer-blender" (Moulinex) contenant 100 mL du solvant d'extraction (méthanol + solution de bicarbonate à 3%, 50+50), puis mélanger pendant 2 min à vitesse maximale. L'extrait ainsi obtenu a été

centrifugée dans une centrifugeuse réfrigérée à 3000 tr/min pendant 30 min, et environ 25 mL du surnageant ont été récupérés.

II.2.2. Purification sur colonne d'immunoaffinité

Le principe de fonctionnement de la colonne est la réaction antigène/anticorps. La colonne contient une suspension en gel d'anticorps monoclonaux, spécifiques de l'ochratoxine A, fixés par covalence à un support solide (fig. 15).

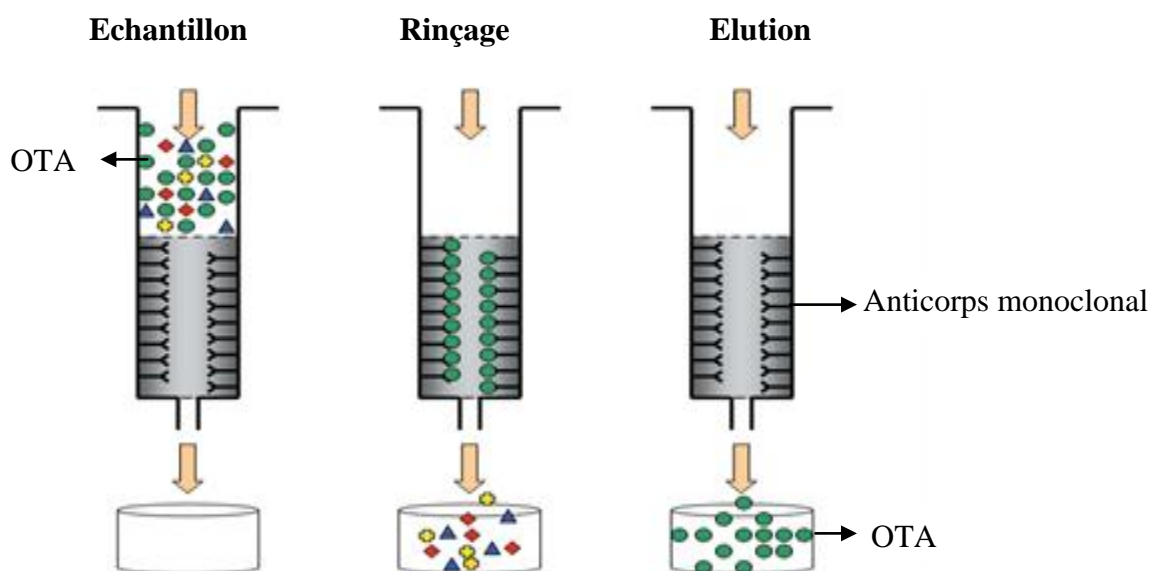


Figure 15 : Principe de fonctionnement d'une colonne d'immunoaffinité

Après extraction des ochratoxines, 10 mL de l'extrait ont été dilués dans 30 mL de tampon phosphate à PH 7,3 (PBS) l'échantillon et introduit dans une colonne d'immunofinité (Ochraprep®, Rhône Diagnostics, Scotland). Si l'extrait possède des ochratoxines, elles vont être captées par les anticorps. La solution doit être à un pH de 7,3 afin de changer la structure des protéines qui constituent les anticorps et de permettre aux ochratoxines de se fixer. Au final, on libère la toxine par élution de la colonne avec du méthanol car il permet la destruction des liaisons antigènes anticorps en modifiant la structure des anticorps. Le

méthanol est ensuite évaporé sous courant d'azote à 70°C. Le résidu est repris par 1 mL de phase mobile (eau/acétonitrile/acide acétique, 51: 48: 1, v/v/v) dans un flacon pour l'analyse par HPLC.

II.2.3. Quantification de l'OTA par HPLC

La quantification de l'OTA est faite à partir des extraits, par HPLC avec une détection fluorimétrique (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) (fig. 17) (Nakajima *et al.*, 1997). Les conditions opératoires sont les suivantes : boucle d'injection de 100 µL, colonne HPLC phase inverse C18, ODS granulométrie 5 µm avec pré-colonne identique, thermostatée à 35°C, débit isocratique de 1mL/min, longueur d'onde d'excitation de 333 nm et d'émission de 460 nm. Les teneurs sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage (Figure 16) établie à partir d'un standard OTA (1µg/mL ; réf PD 226 R. Biopharm Rhône Ltd, Glasgow, UK).

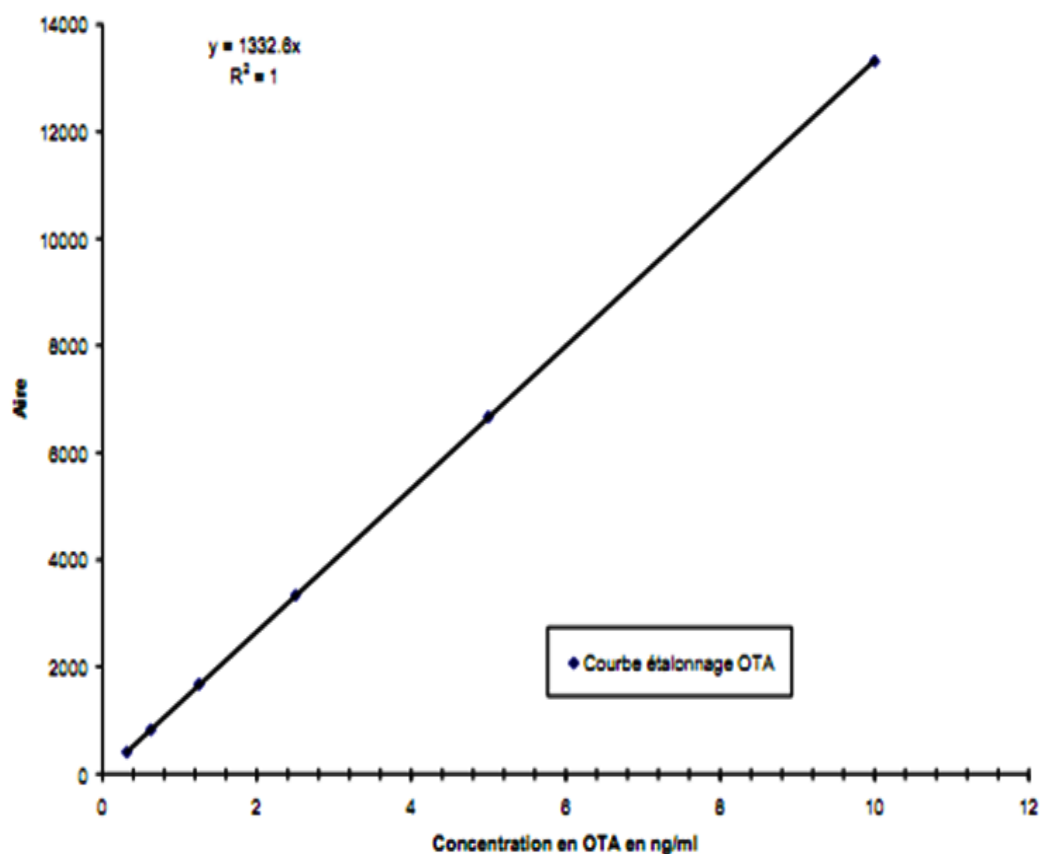


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'OTA



Figure 17: Photo représentant l'appareil HPLC (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) utilisé pour la quantification de l'OTA

III. Méthodes d'isolement et d'identification des champignons

Cette partie décrit les techniques et les milieux qui ont été utilisés pour l'isolement et l'identification des mycètes.

III.1. Milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude des caractères phénotypiques

Divers milieux gélosés ont été utilisés pour l'isolement et l'étude des caractères phénotypiques. Le principal milieu de culture a été le PDA : la gélose Pomme de terre Dextrose Agar, qui est un milieu de base pour l'isolement et la numération des moisissures et des levures. Afin de ralentir la croissance des bactéries, 9mL/L d'acide tartrique à 10 % (pour abaisser le pH à 3,5) et du chloramphénicol à 10 mg/mL ont été ajoutés pour inhiber la croissance bactérienne. A l'exception du chloramphénicol qui est stérilisé par filtration car il est thermosensible, l'acide tartrique et le PDA ont été autoclavés à 121°C pendant 20 min. Le mélange est fait aseptiquement en surfusion (55°C).

Plusieurs autres milieux de culture décrits par Samson *et al.* (2004) ont été utilisés : DG18 : c'est le dichloran 18 % glycérol agar. Le milieu DG18 a été spécifiquement

développé pour l'isolement et la numération des moisissures xérophiles. Il est constitué de peptone (5 g), glucose (10 g), $K_2 HPO_4$ (1 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), dichlorane 0,2 % dans l'éthanol (1 mL), glycérol (220 g), chloramphénicol (0,1 g), agar (15 g) dans 1L d'eau distillée.

Czapek agar : c'est un milieu constitué de $NaNO_3$ (3 g), KCl (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ (10 mg), K_2HPO_4 (1 g), saccharose (30 g), agar (20 g) dans 1L d'eau distillée. Le pH du mélange est ajusté à 6,2 avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 min.

CYA : il est constitué de $NaNO_3$ (3 g), K_2HPO_4 (1 g), KCl (0,5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ (10 mg), extrait de levure (5 g), saccharose (30 g), agar (20 g) dans 1L d'eau. Le pH du mélange est ajusté à 6,0 - 6,5 avant d'être autoclavé à 121°C pendant 20 min.

MEA : Ce milieu est composé d'extrait de malt (30g), de la peptone (3 g), de l'agar (15 g) dans 1 L d'eau distillée. Le mélange est autoclavé à 121°C pendant 20 min.

III.2. Isolement des moisissures

La méthode décrite par Pit *et al.* (1997) a été utilisée. La surface des grains de café a été préalablement nettoyée superficiellement pendant 10 minutes avec une solution aqueuse de NaOCl à 1° et les grains ont été rincés successivement à l'eau distillée stérile trois fois de suite pendant une durée totale de 15 minutes.

Cinq grains ainsi nettoyés ont été déposés dans des boîtes de pétri (en triple) contenant les milieux de culture PDA et DG18, supplémenté au chloramphénicol (60µg/mL). Les boîtes de pétri ont été incubées à $25 \pm 2^\circ C$ pendant 5 à 7 jours. Les observations visuelles ont été effectuées toutes les 24h et les colonies présentant l'aspect général des différents genres ont été prélevées à l'aide de l'anse de platine stérile et ont été purifiées. (Figure 18 et 19).



Figure 18 : Colonies de moisissures sur DG18 ensemencé de grains de café. (Noonim *et al.*, 2008)



Figure 19 : Colonies de moisissures sur PDA ensemencé de grains de café. (Noonim *et al.*, 2008)

Le taux d'infection des grains de café et le nombre d'échantillons contaminés par les différents genres et espèces de moisissures ont été enregistrés. Le degré de contamination est exprimé en pourcentage de grains et d'échantillons contaminés selon la formule suivante :

$$\%GC = \frac{NGC}{NTG} \times 100$$

%GC = Pourcentage de grains contaminés ;

NCG = Nombre de grains contaminés ;

NTG = Nombre total de grains.

III.3. Identification des moisissures

L'identification des moisissures s'est basée sur les caractères cultureux et morphologiques ; la confirmation des identités s'est faite par PCR et séquençage.

III.3.1. Caractères cultureux sur les milieux de culture

L'examen des cultures a été fait à l'œil nu ou à la loupe. Les caractères cultureux étudiés ont été la couleur des colonies (envers et endroit) et leur variation dans le temps,

couleur et changement de couleur du milieu, la texture de la surface et l'odeur (Guiraud, 1998 ; Samson *et al.*, 2004). En plus du milieu PDA, les milieux Czapeck agar, CYA, MEA ont été utilisés pour l'identification des moisissures du genre *Aspergillus*. Les caractères cultureux sur les milieux CYA et MEA ont été comparés à ceux décrits par Samson *et al.* (2007).

III.3.2. Caractères morphologiques microscopiques

L'examen microscopique a été fait grâce à des préparations à l'état frais. L'observation a été réalisée au grossissement x 100 et x 400 d'un microscope optique (Nikon). Les moisissures isolées ont été identifiées selon des critères morphologiques répertoriés en fonction des caractères suivants : hyphes cloisonnées ou non, caractéristiques et type de conidiogénèse, morphologie et structure des spores ou conidies (Guiraud, 1998 ; Samson *et al.*, 2004).

La confirmation de l'identification des souches isolées a été réalisée par PCR suivit d'un séquençage.

III.3.3. Confirmation de l'identité des souches isolées par PCR et séquençage

III.3.3.1. Extraction de l'ADN des moisissures

L'extraction de l'ADN des moisissures s'est fait suivant le protocole décrit par El Sheikha *et al.* (2009, 2010). Les spores des moisissures ont été prélevées des boîtes de Pétri sous conditions aseptiques, en utilisant de l'eau distillée stérile avec 0,1% de Tween 80 ; puis introduits dans des tubes Eppendorff de 2 mL (en double) ; des billes de verre (0,3 g) de diamètre de 425 - 600 μm (Sigma, France) sont ajoutées à la suspension obtenue. Le mélange

est agité vigoureusement pendant 30 min dans un agitateur Vortex (Genie 2 SI-A256, USA) puis centrifugé à 12000 g pendant 15 min et le surnageant est éliminé.

Le culot cellulaire est resuspendu dans 300 μL de tampon d'hydrolyse [2% Triton X-100 (Prolabo, France); 1% de SDS, 100 mM NaCl (Sigma, France), 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France)] ; 100 μL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Promega, France), pH 8,0.

100 μL de solution de lysozyme (25 mg.mL⁻¹, Eurobio, France) et 100 μL de solution de protéinase K (20 mg. mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est incubé à 42°C pendant 20 min. Ensuite, 50 μL de SDS 20% sont ajoutés à chaque tube, puis les tubes sont incubés à 42°C pendant 10 min. 400 μL de MATAB (Sigma, France) ont été ajoutés à chaque tube qui ont ensuite été incubés à 65°C pendant 10 min et agités vigoureusement pendant 5 min. 700 μL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v Carlo Erba, France) est ajouté deux fois et les tubes sont agités au vortex pendant 5 min, puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse est transférée dans un tube Eppendorf et le phénol résiduel, éliminé par extraction avec 600 μL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé pendant 15 min à 12 000 g.

La phase aqueuse est recueillie et l'ADN est stabilisé avec 30 μL d'acétate de sodium (3 M, pH 5), suivie d'une précipitation par ajout d'un volume égal d'isopropanol glacé et l'ADN dans l'isopropanol est conservé à -20°C pendant 12 h (nuit). Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavées avec 500 μL d'éthanol à 70%, et les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 45 - 60 min. Enfin, l'ADN est remis en suspension dans 50 μL d'eau ultra pure (Eppendorf, Allemagne) et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

III.3.3.2. Vérification de l'extraction d'ADN sur gel d'agarose

Avant d'amplifier les séquences cibles de l'ADN extrait, il faut en vérifier son existence et sa pureté par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 0,8% (p/v) dans un tampon TAE 1X (Eppendorf, Allemagne).

8 µL de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur de 16,21 kb (Invitrogen, USA). La migration dure de 45 min à 1h sous une tension de 100 V.

A la fin de la migration, le gel d'agarose (Promega, France) est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 50 µg/mL pendant 15 min, puis rincé durant 15 min à l'eau avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et la photo est traitée grâce au système Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

III.3.3.3. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Amorces utilisées pour les moisissures

Le couple d'amorce utilisé pour les moisissures est GC U1f et U2r. Le Primer U1 correspond aux coordonnées 403 à 422, et l'amorce U2 correspond aux coordonnées de 645 à 662 d'un ADN de référence de *S. cerevisiae* issu du génome 28S (J01355 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 260 pb en cas d'utilisation en PCR (Sandhu *et al.*, 1995 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008 ; Khot *et al.*, 2009 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010).

Tableau 6 : Séquence des amorces pour les moisissures utilisées en PCR

Amorces	Position*	Séquences
GCU1f (Sigma, France)	403 - 422	(Sigma, France) 5' - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA – 3'
U2r (Sigma, France)	645 – 662	5' - GAC TCC TTG GTC CGT GTT – 3'

*Numérotation établie pour *S. cerevisiae*

Préparation du mélange réactionnel de PCR

La PCR est réalisée dans une plaque de 96 puits Sorenson TM (BioScience, USA). Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par El Sheikha et Montet (2010) ; El Sheikha *et al.* (2010) (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel de PCR des moisissures

Réactifs	Volume par puits (µL)	Concentration finale dans le mix (50µL)
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	16,25	/
DMSO	2,5	/
Amorce GC U1f (Sigma, France)	10	0,2 µM
Amorce U2r (Sigma, France)	10	0,2 µM
MgCl ₂ 25 mM (Promega, France)	1	1,5 mM
dNTPs 10mM par dNTP (Promega, France)	3	0,2 mM
Tampon tag, 10X (Promega, France)	5	1
Taq polymérase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25 U
Extrait d'ADN	2	/

Condition de la PCR et appareillage

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA). Pour l'amplification, une PCR est préconisée selon les méthodes de El Sheikha et Montet (2010) ; (Figure 20). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis une série d'opérations répétées 30 fois incluant une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une hybridation à 50°C pendant 50 sec, et une élongation à 72°C pendant 90 sec. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min.

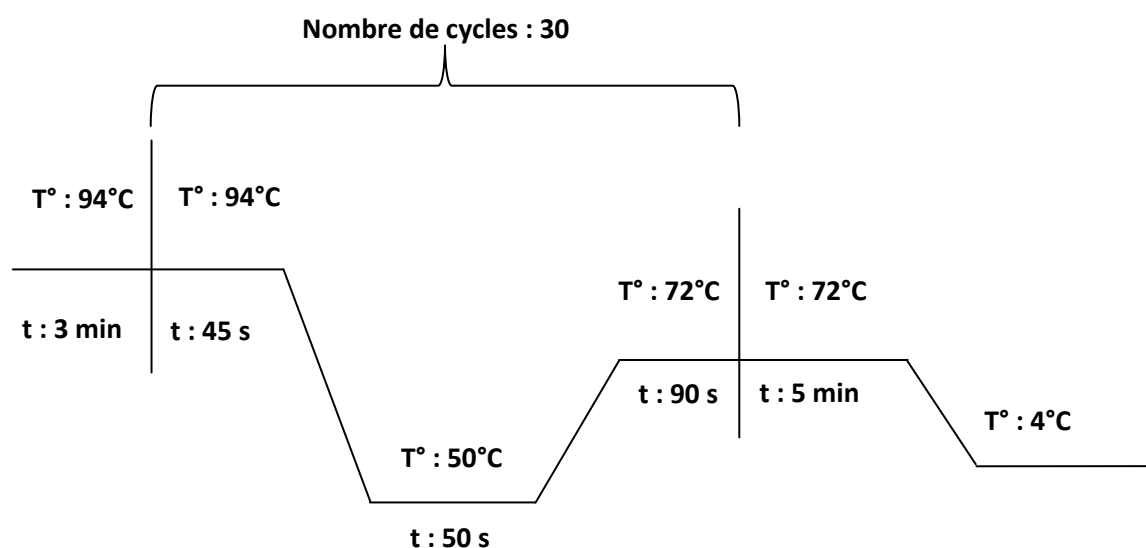


Figure 20 : Conditions de réaction de la PCR pour les ADN des moisissures

Vérification des produits PCR

Avant de réaliser la migration sur le gel de DGGE, les amplicons de PCR ont été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2% (p/v) dans un tampon TAE 1X. La méthode est la même que celle décrite au paragraphe III.3.3.2.

La taille attendue des produits PCR est de 260 pb pour les moisissures (Laforgue *et al.*, 2009). Le marqueur de taille est un marqueur de 100 pb (Promega, France). La migration dure 30 min sous une tension de 100 V.

III.3.4. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes de PCR

Après réamplification de l'ADN des moisissures dans les mêmes conditions que celles citées en III.3.3.2 (avec des amorces sans GC-clamp) et migration sur un gel Low Melting Point (Sigma A 9414-25G) à 1 %, les bandes visibles sur le gel ont été découpées avec un scalpel stérile et récupérées dans un micro-tube Eppendorf. Les tubes contenant les morceaux de gel ont ensuite été incubés dans un bain-marie à 70°C, jusqu'à fonte totale de l'agarose. La purification de cet ADN a été faite par l'utilisation d'un kit Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega, France) (Annexe 2). Les colonnes contenues dans ce Kit possèdent des membranes de purification d'ADN à base de silice. Le principe d'action de ce kit est basé sur le fait que l'ADN de poids moléculaire connu est purifié en utilisant une procédure simple et rapide de « liaison-lavage-élution » et un volume d'élution de 30-50 µl. Un indicateur de pH intégré permet de déterminer facilement le pH optimal pour la liaison de l'ADN à la colonne. Les Fragments d'ADN purifiés avec ce système sont prêts à être utilisés directement dans toutes les applications, y compris le séquençage, la ligation et la transformation, la restriction, l'étiquetage, la microinjection, la PCR, et la transcription *in vitro*.

Les ADN ainsi purifiés ont été envoyés pour leur séquençage à GATC Biotech (Allemagne). Les séquences des ADNr 28S obtenues ont été comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches. Pour différencier *A. ochraceus* de *A. westerdijkiae*, deux jeux de

primers ITS ont été utilisés (Sartori *et al.*, 2006) et Beta tub (Morello *et al.*, 2007). S'il y a amplification avec ITS, il est impossible de différencier les deux souches ; mais dans le cas où l'amplification est effective avec Beta tub, la souche amplifiée est bien *A. westerdijkiae*.

IV. DETERMINATION DU PROFIL FONGIQUE PAR PCR-DGGE

IV.1. Extraction direct de l'ADN des moisissures présentes sur le café et amplification par PCR

8g de chaque échantillon de café ont été prélevés aseptiquement puis introduit dans des tubes stériles de 50 mL, contenant 10 mL d'eau peptonée stérile. Les tubes ainsi préparés, ont été placés sur un vortex rotatif, et soumis à une agitation pendant 1h. 2 mL de surnageant ont ensuite été prélevés et introduits dans des tubes Eppendorf de 2 mL contenant 0,3 g de billes de verres. La suite de l'extraction s'est faite suivant le protocole d'El Sheikha *et al.* (2010) décrit dans le paragraphe III.3.3.1.

Après vérification des extraits d'ADN sur gel d'agarose à 0,8% et amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (cf. III.3.3.2), ceux-ci ont été analysés en DGGE.

IV.2. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

IV.2.1. Composition du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr 28S amplifiés par PCR ont été analysés par DGGE dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Promega, France) contenant un gradient de dénaturant chimique qui s'étend de 40% à 70% pour les moisissures (El Sheikha *et al.*, 2010) constitué d'urée (Promega, France) et de formamide (Promega, France) (Tableau 8). L'appareil de DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

Tableau 8 : Composition des gels de DGGE

Constituants	40% de dénaturant	70% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	16.8 g	29.4 g
Formamide	20 mL	20 mL
Urée	16 mL	28 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	10 mL

IV.2.2. Préparation du gel DGGE

Dans deux tubes de 50 mL d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA) (Figure 21) sont mélangés respectivement 16 mL des solutions froides (stockées à 4°C) de 40% ou 70% de dénaturants auxquels sont ajoutés 50 µL de persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France) à 10% p/v en eau distillée et 50 µL de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Promega, France).

Le gel est coulé dans un moule de 0,75 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre de 200 mm de côté. Une pompe Percom-I, Watson-Marlon (USA) réglée à 20 tours/min permet de transférer le gel du préparateur de gradient jusqu'au moule. La durée de polymérisation du gel est d'une heure au minimum.

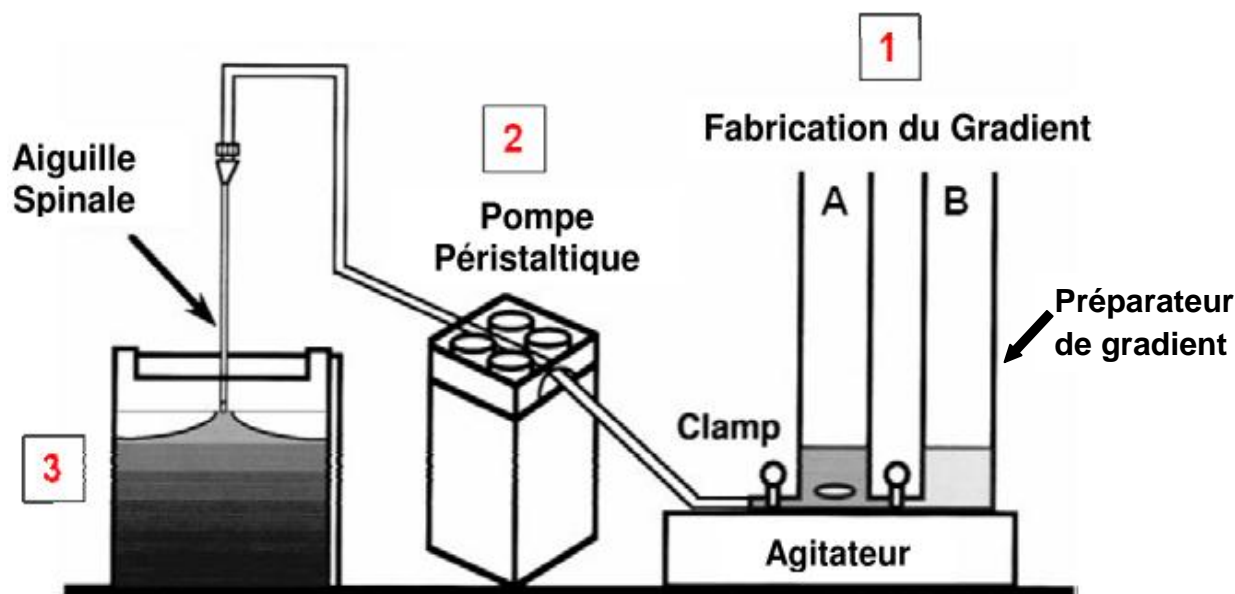


Figure 21 : Préparation du gel de DGGE : (1) Fabrication du gradient, A: solution de haute concentration en dénaturant (70%), B: solution à faible concentration en dénaturant (40%), (2) Pompe péristaltique (3) sandwich des deux plaques de verre insérant le gel.

IV.2.3. Conditions électrophorétiques de la DGGE

La cuve d'électrophorèse (Bio-Rad DCode System, USA) remplie de tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 8,3), est préchauffée pendant 1h30 avant les dépôts pour atteindre la température de migration de 60°C (Díez *et al.*, 2001a).

Le gel de DGGE est placé dans la cuve préchauffée à 60°C, et 10 μ L de colorant bleu/orange (Promega, France) et 30 μ L des produits issus de la PCR sont déposés par puits à l'aide d'une micropipette.

L'électrophorèse est réalisée en deux périodes successives, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 16h (El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010). Après la migration, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de Bromure d'éthidium à 0,5 μ g/mL pendant 30 min puis rincé avec de l'eau distillée (ou par du tampon TAE 1X) pendant 20 min. Le gel est ensuite observé sur le trans-illuminateur UV à

318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et traité grâce au system Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

IV.2.4. Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE

L'image visualisée sur l'écran d'ordinateur est enregistrée sous format tif. En négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair). Les fichiers des gels sont ensuite traités par le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA).

Afin d'étalonner nos gels, nous avons utilisé 2 produits d'amplification d'ADN de souches pures de moisissures, soit une souche d'*Apergillus niger* et une souche d'*Aspergillus carbonarius*. Ces 2 témoins permettent de vérifier le bon déroulement de la DGGE et servent de témoin de position pour situer les différentes bandes obtenues des échantillons lors de la comparaison des profils de moisissures d'un gel à l'autre.

La différence de distance entre les témoins (*Apergillus niger* et *Aspergillus carbonarius*) est calculée et appelée DTe. Ensuite on prend comme référence la bande d'*Aspergillus carbonarius*, et pour chaque bande X on calcule la différence entre la bande (X) et la bande d'*Apergillus carbonarius* que l'on appelle d. La position relative (PR) de chaque

bande est calculée selon la formule :

$$PR(X) = \frac{d}{DTe}$$

Ainsi, chaque bande d'ADN est caractérisée par sa position relative.

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position ou l'intensité des bandes pour chaque piste correspondant aux dépôts de produit de PCR obtenu à partir d'un extrait d'ADN. Il est possible pour chaque piste de coder la présence ou l'absence d'une bande à une position particulière par 1 (présence) ou 0 (absence) et de construire une matrice binaire à partir de

laquelle un dendrogramme de distances est calculé (Schäfer et Muyzer, 2001 ; Fromin *et al.*, 2002).

Le coefficient de similarité de Dice a été calculé selon la formule (Heyndrickx *et al.*, 1996) :

$$S_{Dice} = \frac{2N_{AB}}{(N_A + N_B)}$$

Où :

N_{AB} représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils),

N_A et N_B : représentent le nombre de bandes dans les échantillons A et B, respectivement.

Une fois la matrice des distances calculée, la méthode statistique UPGMA (Unweigthed Pair-Wise Grouping With Mathematical Averages) est utilisée pour tracer un dendrogramme qui illustre la classification des profils.

La méthode UPGMA est une méthode d'analyse des données binaires qui permet la construction de dendrogrammes et qui dépeint les distances en forme graphique, basées sur le degré de "dissimilarité" entre profils DGGE. Ce qui permet une classification numérique des échantillons en utilisant le coefficient de similarité de Dice (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Lebaron *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2000 ; Ibekwe *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé en utilisant le logiciel Statistica version 7.1 (StatSoft, France).

IV.2.5. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles sur le gel de DGGE sont découpées à partir du gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est ensuite élué dans 100µL du tampon TE à 4°C durant la nuit. 100µL de l'ADN élué à partir de chaque bande a été purifié grâce au kit "Wizard PCR Preps DNA Purification system" (Promega, France) (Annexe 2) puis a été ré-amplifié dans les mêmes conditions mais en utilisant dans ce cas des amorces sans GC-clamp et ensuite envoyé pour leur séquençage chez GATC Biotech (Allemagne).

Cependant, les bandes issues de la même position ont été séquencées afin de vérifier si elles étaient issues de la même espèce. Les séquences des ADNr 28S obtenues ont été comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. TENEUR EN OTA DES GRAINS DE CAFE

I.1. Degré de contamination par l'OTA

Le Tableau 9 donne les teneurs moyennes en OTA en fonction du site de prélèvement, de la période de collecte, le traitement appliqué sur le café, ainsi que l'identité des champignons toxigènes associés aux grains de café issus des campagnes caféières 2009 et 2010. De ce tableau il ressort que la microflore toxigène associée aux grains de café contaminés par l'OTA est constituée majoritairement d'*A. carbonarius* et d'*A. niger*. L'analyse des variances faite avec les résultats obtenus, montre que : l'année de collecte des échantillons, la période de collecte et le type de traitement appliqué influencent significativement les teneurs en OTA dans nos échantillons de café. Cependant de cette même analyse, il ressort que le stade de prélèvement a une influence beaucoup plus accrue sur la teneur en OTA et que le site n'a aucune influence sur celle-ci. Les teneurs moyennes en OTA des grains de café issus du traitement par voie sèche au cours de la campagne caféière 2009, sont comprises entre 0,3 - 4,5 µg/Kg ; 0,3 – 1,9 µg/Kg ; 0,9 – 4,01 µg/Kg ; 0,3 – 0,6 µg/Kg ; 0,4 – 5,11 µg/Kg pour Bafoussam, Dschang, Bafang, Santchou et Melong respectivement. Les teneurs moyennes en OTA des grains de café issus du traitement par voie humide sont comprises entre 0,2 – 142,1 µg/Kg pour Bafoussam et entre 0,12 – 46,81 µg/Kg pour Dschang.

Les résultats du dosage de l'OTA dans les grains de café provenant de la campagne caféière 2010, ont montré que pour le traitement par voie sèche, les teneurs moyennes sont comprises entre 0,25 – 0,47 µg/Kg ; 0,11 – 0,4 µg/Kg ; 0,3 – 10,1 µg/Kg ; 1- 1,5 µg/Kg ; 0,3 – 1,9µg/Kg pour Bafoussam, Dschang, Bafang, Santchou et Melong respectivement. Les teneurs moyennes en OTA des grains de café issus du traitement par voie humide sont comprises entre 0,3 – 1µg/Kg pour Bafoussam et entre 0,1 – 3,85 µg/Kg pour Dschang.

Exception faite des échantillons de cafés issus du traitement par voie humide du début de la campagne caféière 2009 (124,1 µg/Kg et 46,81 µg/Kg), les analyses réalisées sur les échantillons de café montrent que de façon globale, que les grains de café provenant des deux campagnes caféières ont des faibles teneurs en OTA (0,1 - 5,11 µg/Kg) car le règlement (CE) N° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, a fixé comme limite maximale, une valeur de 10 µg/Kg dans le café soluble ; dans le café vert, il n'y a pas encore de norme mais les cafés verts entrant dans l'UE ne doivent pas avoir des teneurs en OTA au-dessus de 10 µg/Kg .

Tableau 9 : Teneur en OTA en fonction du type de traitement, du site et des souches toxigènes associées des campagnes caféières 2009 et 2010.

Période de collecte	Sites	Traitements	Nombre d'échantillons analysés	Teneur moyenne en OTA		Souches toxigènes associées
				Année 2009	Année 2010	
DC (Octobre- Novembre)	Bfss	VS	3	4,5	0,47	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺⁺ , <i>A. ochraceus</i>
		VH	3	124,1	0,3	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺⁺ , <i>A. ochraceus</i>
	Dsch	VS	1	1,9	0,4	<i>A. niger</i> ⁺⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺⁺
		VH	5	46,81	nd	<i>A. niger</i> ⁺⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Baf	VS	1	0,9	10,1	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	San	VS	3	0,35	1,5	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Mel	VS	1	nd	nd	<i>A. niger</i> ⁺⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
MC (Novembre- janvier)	Bfss	VS	2	nd	0,3	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
		VH	2	0,2	1	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Dsch	VS	3	0,3	0,11	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
		VH	2	0,12	3,85	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Baf	VS	2	1,2	0,3	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	San	VS	2	0,6	1,2	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Mel	VS	2	0,4	1,9	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
FC (Janvier- Avril)	Bfss	VS	3	0,3	0,25	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
		VH	2	nd	0,9	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Dsch	VS	3	0,4	0,4	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
		VH	2	nd	nd,1	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Baf	VS	2	4,01	2,5	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺⁺ , <i>A. ochraceus</i>
	San	VS	1	0,3	1	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺
	Mel	VS	2	5,11	0,3	<i>A. niger</i> ⁺ , <i>A. carbonarius</i> ⁺⁺ , <i>A. ochraceus</i>

DC : Début de campagne ; MC : Mi- campagne ; FC : Fin de campagne ; VS : Voie sèche ; VH : Voie humide ; Bfss : Bafoussam ; Dsch : Dschang ; Baf : Bafang ; San : Santchou ; Mel : Melong ; nd : non déterminé

La figure 22 montre les chromatogrammes de confirmation de la présence d'OTA dans les échantillons de café avec co-injection de solution standard d'OTA. De cette figure il ressort que, c'est bien l'OTA qui a été dosé dans nos échantillons car les pics d'identification se situent à la même position que le pic standard. On voit aussi bien dans cette figure, que l'intensité du pic est fonction de la concentration en OTA.

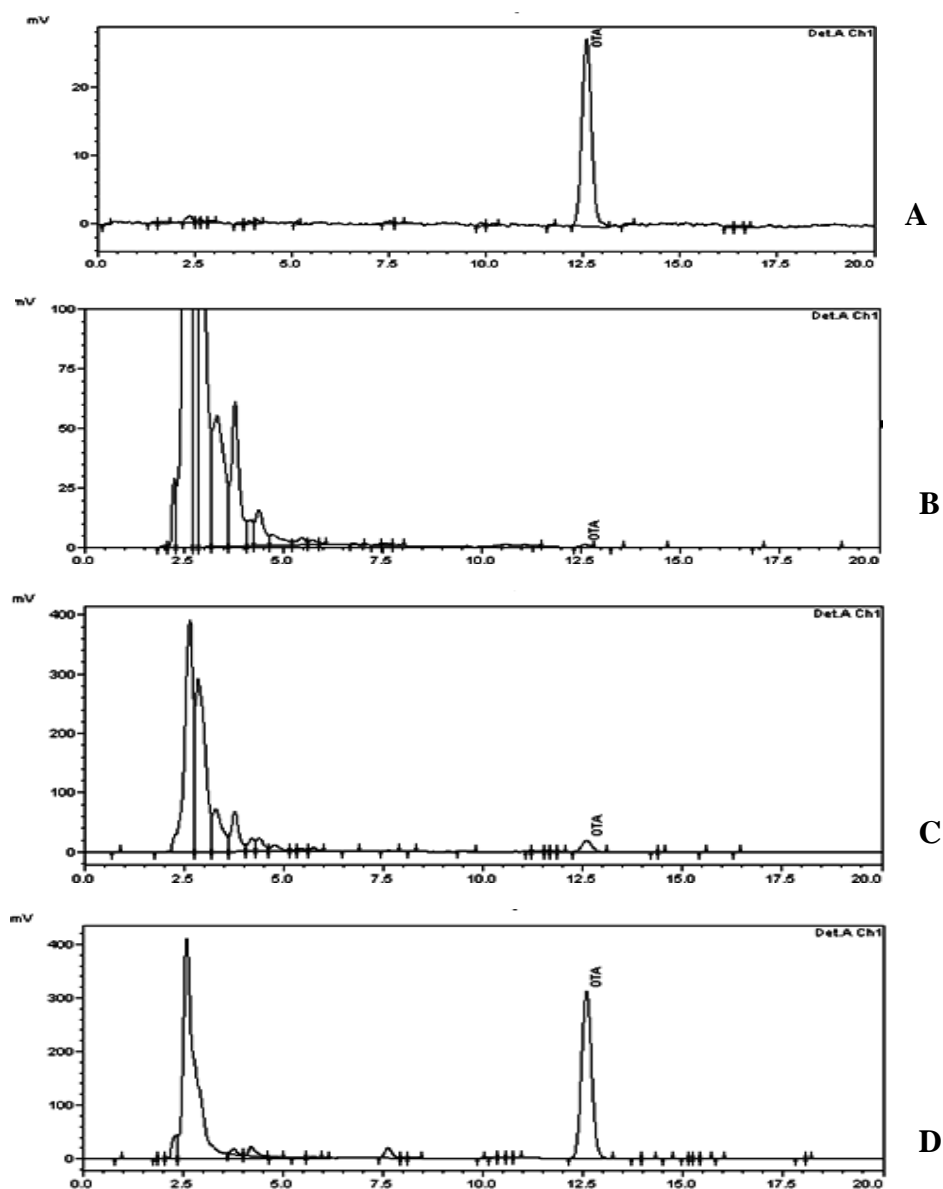


Figure 22: chromatogrammes de confirmation de la présence d'OTA dans les échantillons de café ($0,1 - 31,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$) avec co-injection de solution standard (A: Standard; B: 1810; C: 2910; D: 3309) (1810, 2910, 3309 représente les numéros de références du laboratoire assignés aux échantillons de café analysés).

I.2. Discussion

Ces travaux ont été réalisés afin de déterminer la teneur en OTA des échantillons de café d'où sont isolés les souches toxigènes, afin d'établir une éventuelle relation entre la présence des souches productrices d'OTA et la présence d'OTA. Les mycotoxines étant susceptibles d'engendrer des effets négatifs sur la santé ; il est important pour les pouvoirs publics, de disposer des données et d'outils d'analyse permettant de prévenir les risques liés à cette contamination. Dans le cadre de ce travail, l'OTA a été quantifiée dans les grains de café résultant des différents traitements technologiques par la méthode de Nakajima *et al.* (1997).

L'analyse des variances réalisée sur les 102 échantillons de café analysés a permis de mettre en évidence l'incidence des traitements sur les teneurs en OTA du café. Ce résultat est contraire à celui de Noonim *et al.* (2008) qui sur des analyses faites en Thaïlande sur du café arabica à tous les stades du procédé de transformation n'a pu établir une relation entre le traitement du café et la teneur en OTA. Les données publiées sur l'impact de la voie humide par rapport à la présence d'OTA sont insuffisantes. Frank a observé en 1999 que pendant la fermentation, il y a d'ordinaire une réduction du nombre des champignons filamenteux au profit des levures (Frank, 1999). D'un autre côté, il a été supposé qu'avec l'élimination de la pulpe (mésocarpe), on élimine un excellent substrat pour le développement des souches productrices d'OTA (Joosten *et al.*, 2001).

Mais pour ce qui est du café robusta traité par voie sèche, Noonim *et al.* (2008) ont noté une augmentation de la contamination lorsqu'il passait des cerises sèches au café vert ; dans ces travaux, ils ont associé ce fort taux de contamination au fait que le café en Thaïlande est très souvent en contact avec le sol durant le processus de séchage et ce contact avec le sol pourrait augmenter l'occurrence des souches toxigènes. A contrario, Il a été montré que la formation d'OTA a lieu pendant le séchage des cerises au soleil, principalement dans la pulpe

et la coque ; par contre, la concentration d'OTA dans le café vert a été trouvée jusqu'à 100 fois plus basse par rapport à la coque, ce qui suggère l'hypothèse d'une contamination superficielle (Bucheli *et al.*, 2000) et de la réduction de la présence de souches productrices d'OTA par l'élimination des membranes externes (Frank, 1999 ; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004).

Suarez-Quiroz *et al.* (2004) ont montré dans leur étude au Mexique des différences de contamination par l'OTA entre divers processus du café traité par voie sèche, voie humide traditionnelle et voie humide écologique. Ils ont expliqué ces différences par le fait que, dans les voies humides, le dépulpage entraîne une baisse différente selon qu'il y a fermentation ou non. La baisse la plus forte obtenue par le procédé mécanique peut s'expliquer par l'élimination d'une couche externe riche en toxine, alors que la voie fermentaire « plus humide » et d'une durée plus longue peut favoriser la pénétration (par diffusion) de la toxine dans la parche. Le déparchage élimine alors la toxine par la perte d'une nouvelle couche « externe ». Par contre, au cours de la voie sèche, l'augmentation de la teneur en OTA ne peut être expliquée que par une néosynthèse à partir de souches contaminatrices toxigènes.

Dans le cadre de ce travail les échantillons ont été prélevés en début, mi et fin de campagne. Le fort taux de contamination observé en début de campagne 2009 par le procédé de traitement par voie humide, pourrait résulter d'une fermentation assez longue au cours du traitement, des conditions climatiques et environnementales ou de l'état phytosanitaire des grains de café au moment de la récolte et de la transformation (Duris *et al.*, 2010).

L'ochratoxine peut provenir de la contamination de la cerise « au champ » par des moisissures toxigènes, la toxinogénèse intervenant avant ou après la récolte et dans ce cas au cours du processus ou après, ce qui suppose la persistance de moisissures productrices. Elle peut être également due à une recontamination post-process. Pendant les traitements technologiques, il est possible d'établir une certaine relation entre la teneur en OTA des fèves

et la microflore toxigène associée car *A. carbonarius*, *A. niger* et *A. ochraceus* sont les microflores toxigènes associées aux grains présentant les plus fortes teneurs en OTA. Dans leurs travaux, Noonim *et al.* (2008) ont trouvé que 100% des souches d'*A. carbonarius*, et 13% des souches d'*A. niger* isolées des échantillons de café Thaïlandais produisent de l'OTA ; Taniwaki *et al.* (2003) dans des analyses d'échantillons de café brésilien ont trouvé que 75% des souches d'*A. ochraceus* et 3% des souches d'*A. niger* isolées produisent de l'OTA. En outre, dans ce travail sur certains échantillons fortement contaminés par des souches à fort potentiel toxigénique, il n'a pas été possible de déterminer et de quantifier l'OTA. Cette étude est en accord avec les observations d'autres auteurs qui ont conclu qu'un taux significatif d'infection n'entraîne pas nécessairement le risque de contamination par l'OTA (Frank, 1999 ; Taniwaki *et al.*, 2003). Bien que les facteurs qui influencent le développement fongique doivent être pris en compte, il convient de souligner que la présence de moisissures n'implique pas forcément la synthèse de l'OTA. A l'inverse, il est possible de détecter la mycotoxine en l'absence de la moisissure productrice. Les formes végétatives et germinatives de la moisissure peuvent être inactivées par les processus chimiques ou environnementaux, alors que l'OTA, plus stable, demeure inaltérée dans le substrat (Gimeno, 2000).

Les différences entre process sont jusqu'à présent surtout axés sur l'aspect économique, l'incidence sur l'environnement et sur les conséquences au niveau de la qualité aromatique (Mendez *et al.*, 2001 ; Puerta, 1999). Il est clair que le paramètre « sensibilité » à la production d'OTA et ses conséquences sanitaires doivent être pris en compte dans une discussion globale sur le choix d'un procédé, vu que d'autres auteurs ont montré que la voie humide écologique est la plus favorable pour limiter l'évolution et l'impact de la flore toxigène contaminante « du champ » (Suarez-Quiroz *et al.*, 2004).

I.3. Conclusion partielle

Le suivi des chaînes de production au cours des deux campagnes caféières 2009 et 2010, et des deux traitements post-récolte (voie humide et voie sèche), a permis d'observer qu'après le séchage et quel que soit le type de process, le taux de contamination par les souches toxigènes est relativement élevé. Le type de traitement affecte significativement la toxinogénèse. Bafoussam et Dschang apparaissent comme étant les sites les plus contaminés en OTA, mais de façon globale, les échantillons de café provenant des cinq sites de notre étude ont des teneurs en OTA non inquiétante pour les consommateurs et même, ne saurait constituer un frein pour son exportation. Un taux significatif d'infection fongique n'entraîne pas nécessairement le risque de contamination par l'OTA, par contre chaque fois qu'un échantillon a présenté une forte teneur en OTA, une souche toxigénique (*A.carbonarius* en particulier) a été isolée, ce qui montre que la présence d'une souche fortement productrice peut constituer un risque non négligeable de contamination en OTA. De plus, les conditions climatiques environnementales (température, précipitations et humidité relative) constituent un facteur extrinsèque à la toxinogénèse.

Le problème de contamination des échantillons de café en ochratoxine A (OTA) ayant été mis en évidence dans cette partie, il serait intéressant de connaître le profil fongique de ces derniers, car les champignons sont la principale source de production de cette toxine. C'est ce qui fera l'objet de la seconde partie qui portera sur la caractérisation de la mycoflore par les techniques classique de microbiologie, par PCR et par séquençage.

II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES MOISSURES

II.1. Campagne caféière 2009

II.1.1. Evolution qualitative de la mycoflore

La Figure 23 donne l'aspect phénotypique de quelques moisissures isolées et le tableau 10 montre la fréquence des souches isolées en fonction du site, du traitement et de la période de collecte. De ce tableau il ressort que, les souches isolées appartiennent essentiellement aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Scopuloriopsis* et *Aspergillus* sp. Le genre *Aspergillus* présente différentes espèces : plusieurs sont de couleur noire et correspondent à la section *Nigri* qui contient des espèces reconnues comme productrices d'OTA (que nous classerons présomptivement sur des critères morphologiques comme *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius*). L'analyse des variances a montré qu'il n'existe pas de différence significative pour les moisissures isolées en fonction du type de traitement, du site ou du stade de prélèvement de la campagne caféière. *A. carbonarius* et *A. niger* sont les souches dominantes dans tous les sites, mais *A. carbonarius* à une fréquence beaucoup plus élevée à Bafoussam (35-45%) et à Dschang (35-40%). Par contre *A. niger* apparaît comme espèce dominante à Bafang (35-40%), à Santchou (40-45%) et à Melong (30-35%). Ce tableau a également permis de montrer que, le type de flore ne change pas lorsqu'on passe d'une étape du process à l'autre, mais le dépulpage réduit la fréquence de la contamination fongique.

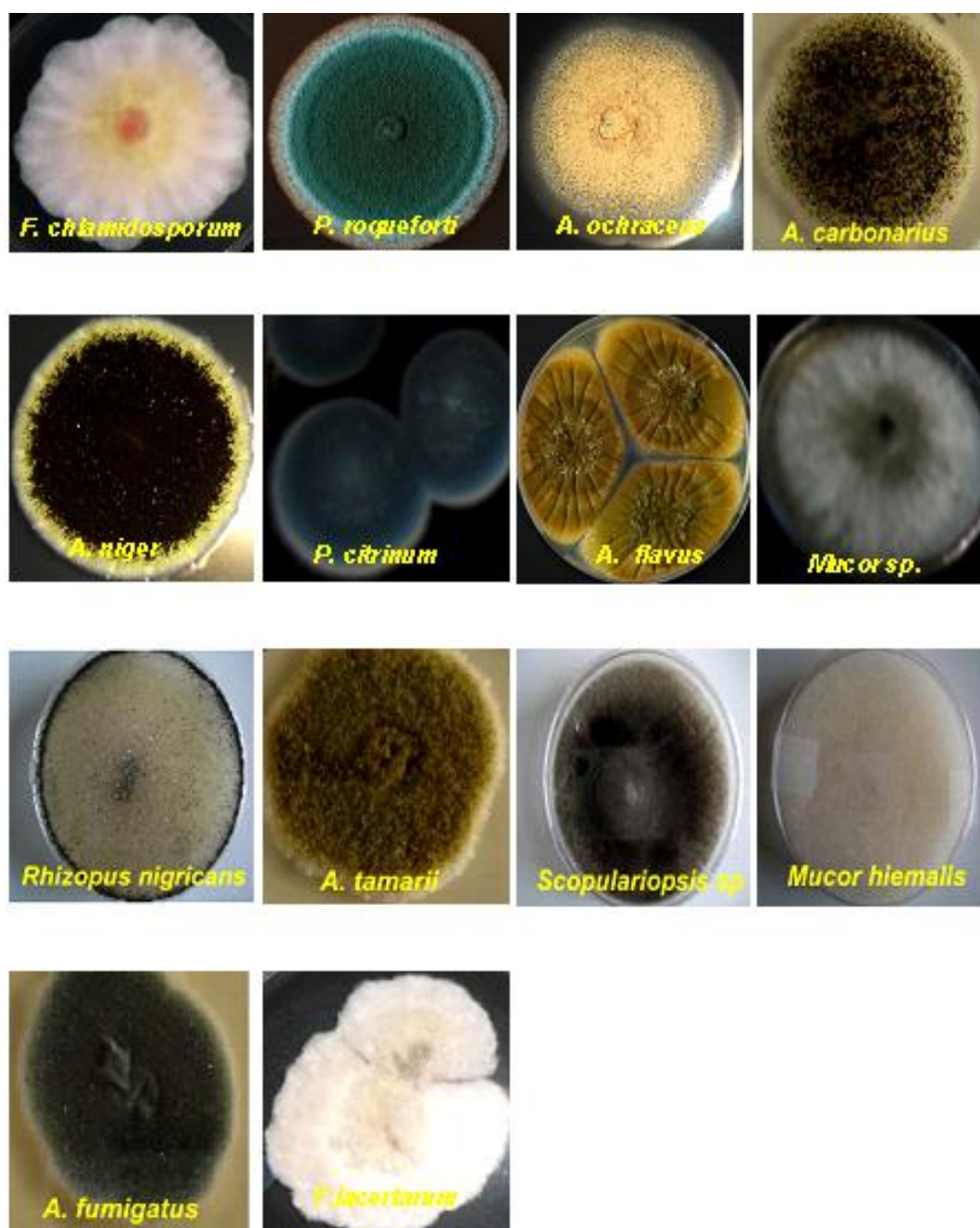


Figure 23 : Photos des moisissures isolées au cours des traitements technologiques

Tableau 10: Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (aux 3 stades étudiés au cours de la campagne 2009).

Sites	Traitement	PC	Fréquence des souches isolées
Bfss	VS	I _b	<i>A niger</i> (30%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. tamarii</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (3%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (5%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (6%) ; <i>F. lacertarum</i> (6%)
		II	<i>A niger</i> (20%) ; <i>A. carbonarius</i> (35%) ; <i>A. tamarii</i> (1%) ; <i>A. ochraceus</i> (1%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (10%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (13%) ; <i>P. roqueforti</i> (5%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (3%) ; <i>F. lacertarum</i> (7%)
	VH	I _a	<i>A niger</i> (22%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>A. oryzae</i> (2%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (2%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (7%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (8%) ; <i>A. tubigensis</i> (1%)
		II	<i>A niger</i> (18%) ; <i>A. carbonarius</i> (45%) ; <i>A. ochraceus</i> (3%) ; <i>A. oryzae</i> (2%) ; <i>P. roqueforti</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (4%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (7%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (9%) ; <i>A. tubigensis</i> (6%)
Dschr	VS	I _b	<i>A niger</i> (30%) ; <i>A. carbonarius</i> (35%) ; <i>A. oryzae</i> (1%) ; <i>A. ochraceus</i> (8%) ; <i>P. citrinum</i> (5%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (7%)
		II	<i>A niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (35%) ; <i>A. oryzae</i> (1%) ; <i>A. ochraceus</i> (10%) ; <i>P. citrinum</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (8%) ; <i>Mucor sp</i> (7%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (2%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (8%)
	VH	I _a	<i>A niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. tamarii</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (10%) ; <i>P. citrinum</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (1%) ; <i>Mucor sp</i> (4%) ; <i>Fusarium sp.</i> (2%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (7%) ; <i>A. tubigensis</i> (7%)
		II	<i>A niger</i> (20%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. tamarii</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (5%) ; <i>P. citrinum</i> (8%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (5%) ; <i>Fusarium sp.</i> (2%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (10%) ; <i>A. tubigensis</i> (2%)
Baf	VS	I _b	<i>A niger</i> (40%) ; <i>A. carbonarius</i> (20%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (7%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>P. roqueforti</i> (8%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (9%)
		II	<i>A niger</i> (35%) ; <i>A. carbonarius</i> (22%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (6%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (12%) ; <i>P. roqueforti</i> (10%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (9%) ;
San	VS	I _b	<i>A niger</i> (45%) ; <i>A. carbonarius</i> (25%) ; <i>A. tamarii</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>P. citrinum</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (2%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (6%) ; <i>F. lacertarum</i> (1%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (8%)
		II	<i>A niger</i> (40%) ; <i>A. carbonarius</i> (20%) ; <i>A. tamarii</i> (3%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>P. citrinum</i> (8%) ; <i>A. flavus</i> (8%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>F. lacertarum</i> (2%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (10%)
Mel	VS	I _b	<i>A niger</i> (35%) ; <i>A. carbonarius</i> (25%) ; <i>A. oryzae</i> (5%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>P. citrinum</i> (4%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (8%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (5%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (2%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (10%)
		II	<i>A niger</i> (30%) ; <i>A. carbonarius</i> (20%) ; <i>A. oryzae</i> (8%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>P. citrinum</i> (4%) ; <i>A. flavus</i> (9%) ; <i>Mucor sp</i> (8%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (8%)

VS : Voie sèche ; VH : Voie humide ; Bfss : Bafoussam ; Dschr : Dschang ; Baf : Bafang ; San : Santchou ; Mel : Melong ; I_b : cerises de café sèches ; I_a : café en parche séché ; II : café vert .

Le tableau 11 nous donne un détail des profils fongiques obtenus par caractérisation morphologique et moléculaire de nos échantillons de café. De ce tableau, il ressort que : l'identification moléculaire a permis de confirmer les identités des différentes souches isolées et caractérisées par les méthodes culturelles classiques. De plus grâce à cette méthode, les genres et les espèces de nos moisissures ont pu être établis, ceci à des fréquences comprises entre 95 et 100%.

Tableau 11 : Comparaison des identifications des moisissures par les critères morphologiques et moléculaires.

^a Souches de moisissures	Identification morphologique	Identification moléculaire	
		Nom de la souche	Fréquence (%)
1	<i>Mucor</i> sp	<i>Mucor hiemalis</i>	100
2	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium chlamidosporum</i>	97
3	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium lacertarum</i>	95
4	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	95
5	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	100
6	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	97
7	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	98
8	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	100
9	<i>Aspergillus westerdijkiae/ochraceus</i>	<i>Aspergillus Ochraceus</i>	98
10	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	100
11	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	95
12	<i>Mucor</i> sp	<i>Mucor</i> sp	95
13	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus tubigenensis</i>	96
14	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus Tamarii</i>	97
15	<i>Rhizopus</i> sp	<i>Rhizopus</i> sp	98
16	ni	<i>Scopuloriopsis</i> sp	97
17	ni	<i>Cladosporum</i> sp	100

^anuméro d'échantillon assigné au laboratoire ; ni : non identifié

II.1.2. Etude du taux de contamination des grains de café par les moisissures

Le degré d'infection des fèves par les moisissures a été étudié par ensemencement direct sur les milieux DG18 et PDA. La forte contamination des grains de café par les moisissures est confirmée (Tableau 12). Le taux de contamination par les moisissures totales varie entre 40 et 82 % en début de saison, et connaît une augmentation en mi-saison où elle est comprise entre 50 et 94 %, puis croît encore d'avantage en fin de saison avec un taux compris entre 60 et 100 % des fèves contaminées. Les *Aspergillus* à potentiel producteur d'Ochratoxine A (OTA) apparaissent à tous les stades du traitement du café avec une prévalence beaucoup plus accrue pour *A. niger*, *A. carbonarius* et enfin *A. ochraceus*.

Tableau 12 : Taux de contamination des grains de café par les moisissures et les *Aspergillus* potentiellement capables de produire l'OTA (campagne 2009)

	Type de traitement	Stade de prélèvement	Taux de contamination par les moisissures totales (%) ^a	Taux de contamination par les moisissures ochratoxinogéniques (%)		
				<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>
DC	Voie sèche	I _b	82	42	18	3
		II	55	18	20	5
	Voie humide	I _a	65	40	12	15
		II	40	20	15	3
MC	Voie sèche	I _b	94	38	22	2
		II	65	20	22	3
	Voie humide	I _a	60	45	9	5
		II	50	30	10	1
FC	Voie sèche	I _b	100	40	20	4
		II	60	16	24	8
	Voie humide	I _a	55	35	15	25
		II	60	25	20	2

^a Ensemencement direct de 470 grains de café ; DC : début de campagne ; MC : mi-campagne ; FC : fin de campagne ; I_b : cerises de café sèches ; I_a : café en parche séché ; II : café vert.

II.2. Campagne caféière 2010

II.2.1. Etude de la microflore fongique au cours du traitement

Le Tableau 13 donne l'identification de la microflore fongique dans les échantillons de café issus des trois stades de prélèvement de la campagne caféière 2010. Pendant le traitement du café, les moisissures isolées des grains issues de la campagne caféière 2010 sont quasi identiques à celles de la campagne 2009. Elles appartiennent essentiellement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scopuloriopsis*, *Cladosporium*, *Fusarium*. Après analyse des variances (annexe 4), il ressort qu'il n'existe pas de différence significative pour les moisissures isolées en fonction du type du traitement subi. *A. niger*, *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sont les espèces potentiellement toxigènes isolées au cours du traitement technologique du café. Le tableau 13 donne la fréquence des souches isolées en fonction du site, du traitement et de la période de collecte. Il ressort de ce dernier que, *A. carbonarius* et *A. niger* sont les souches dominantes dans tous les sites, mais *A. carbonarius* a une fréquence beaucoup plus élevée à Bafoussam (35-40%) et à Dschang (30-45%). Par contre *A. niger* apparaît comme espèce dominante à Bafang (35-40%), à Santchou (25-42%) et à Melong (30-35%). Ce tableau a également permis de montrer que, le type de flore ne change pas lorsqu'on passe d'une étape du process à l'autre, mais le dépulpage réduit la fréquence de la contamination fongique.

Tableau 13: Identification de la microflore fongique isolée pendant les traitements technologiques (aux 3 stades étudiés au cours de la campagne 2010).

Sites	Traitement	PC	Fréquence des souches isolées
Bfss	VS	I _b	<i>A. niger</i> (35%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. tamarii</i> (7%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (3%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (6%) ; <i>P. roqueforti</i> (2%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (1%)
		II	<i>A. niger</i> (20%) ; <i>A. carbonarius</i> (35%) ; <i>A. tamarii</i> (1%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (10%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (15%) ; <i>P. roqueforti</i> (5%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (3%) ; <i>F. lacertarum</i> (2%)
	VH	I _a	<i>A. niger</i> (20%) ; <i>A. carbonarius</i> (45%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>A. oryzae</i> (5%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (7%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (2%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (3%) ; <i>A. tubigensis</i> (1%)
		II	<i>A. niger</i> (15%) ; <i>A. carbonarius</i> (35%) ; <i>A. ochraceus</i> (5%) ; <i>A. oryzae</i> (10%) ; <i>P. roqueforti</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (10%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (7%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (9%) ; <i>A. tubigensis</i> (6%)
Dsch	VS	I _b	<i>A. niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. oryzae</i> (7%) ; <i>A. ochraceus</i> (8%) ; <i>P. citrinum</i> (5%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (3%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (10%)
		II	<i>A. niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (45%) ; <i>A. oryzae</i> (1%) ; <i>A. ochraceus</i> (10%) ; <i>P. citrinum</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (3%) ; <i>Mucor sp</i> (2%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (2%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (8%)
	VH	I _a	<i>A. niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (40%) ; <i>A. tamarii</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (10%) ; <i>P. citrinum</i> (3%) ; <i>A. flavus</i> (1%) ; <i>Mucor sp</i> (4%) ; <i>Fusarium sp.</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (7%) ; <i>A. tubigensis</i> (2%)
		II	<i>A. niger</i> (15%) ; <i>A. carbonarius</i> (30%) ; <i>A. tamarii</i> (7%) ; <i>A. ochraceus</i> (5%) ; <i>P. citrinum</i> (8%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (5%) ; <i>Fusarium sp.</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (10%) ; <i>A. tubigensis</i> (7%)
Baf	VS	I _b	<i>A. niger</i> (40%) ; <i>A. carbonarius</i> (25%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>A. flavus</i> (4%) ; <i>Mucor sp</i> (7%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (8%)
		II	<i>A. niger</i> (35%) ; <i>A. carbonarius</i> (22%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (11%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>P. roqueforti</i> (5%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>F. lacertarum</i> (7%) ;
San	VS	I _b	<i>A. niger</i> (42%) ; <i>A. carbonarius</i> (27%) ; <i>A. tamarii</i> (4%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>P. citrinum</i> (5%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (10%) ; <i>F. lacertarum</i> (1%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (3%)
		II	<i>A. niger</i> (25%) ; <i>A. carbonarius</i> (20%) ; <i>A. tamarii</i> (3%) ; <i>A. ochraceus</i> (4%) ; <i>P. citrinum</i> (8%) ; <i>A. flavus</i> (8%) ; <i>Rhizopus nigricans</i> (15%) ; <i>F. lacertarum</i> (8%) ; <i>Mucor hiemalis</i> (9%)
Mel	VS	I _b	<i>A. niger</i> (35%) ; <i>A. carbonarius</i> (25%) ; <i>A. oryzae</i> (2%) ; <i>A. ochraceus</i> (5%) ; <i>P. citrinum</i> (4%) ; <i>A. flavus</i> (5%) ; <i>Mucor sp</i> (3%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (2%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (15%)
		II	<i>A. niger</i> (30%) ; <i>A. carbonarius</i> (25%) ; <i>A. oryzae</i> (5%) ; <i>A. ochraceus</i> (2%) ; <i>P. citrinum</i> (9%) ; <i>A. flavus</i> (4%) ; <i>Mucor sp</i> (5%) ; <i>P. roqueforti</i> (3%) ; <i>F. chlamidosprum</i> (7%) ; <i>Scopuloriopsis sp.</i> (1%) ; <i>Rhizopus sp.</i> (9%)

VS : Voie sèche ; VH : Voie humide ; Bfss : Bafoussam ; Dsch : Dschang ; Baf : Bafang ; San : Santchou ; Mel : Melong ; Ib : cerises de café sèches ; Ia : café en parche séché ; II : café vert .

II.2.2. Etude du taux de contamination des grains de café

Une forte contamination des grains de café par les moisissures est observée (Tableau 14). Le taux de contamination par les moisissures totales est compris entre 60 et 100 % en début de saison, et baisse légèrement en fin de saison ; ce taux de contamination en moisissures totales est plus élevé que celui observé sur les grains de café prélevé au cours de la saison 2009. A l'exception du début de saison, on note une contamination plus élevée dans les grains traités par voie sèche. Les *Aspergillus* à potentiel producteur d'OTA apparaissent à tous les stades du traitement du café avec une prévalence beaucoup plus accrue pour *A. carbonarius* et *A. niger*.

Tableau 14 : Taux de contamination des grains de café par les moisissures totales et les *Aspergillus* potentiellement capables de produire l'OTA (campagne 2010)

	Type de traitement	Stade de prélèvement	Taux de contamination par les moisissures totales (%) ^a	Taux de contamination par les moisissures ochratoxinogéniques (%)		
				<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>
DC	Voie sèche	I _b	90	35	35	7
		II	68	20	30	4
	Voie humide	I _a	100	25	35	0
		II	60	10	40	2
MC	Voie sèche	I _b	95	25	40	5
		II	72	22	45	8
	Voie humide	I _a	65	15	40	0
		II	62	15	55	2
FC	Voie sèche	I _b	85	30	30	9
		II	70	18	30	6
	Voie humide	I _a	75	35	15	0
		II	58	20	25	0

^a Ensemencement direct de 570 grains de café ; DC : début de campagne ; MC : mi-campagne ; FC : fin de campagne ; I_b : cerises de café sèches ; I_a : café en parche séché ; II : café vert.

II.3. Discussion

La confirmation de l'identité des champignons par séquençage de leur ADN n'avait pas encore fait l'objet de la plupart des travaux antérieurs relatifs à la microflore fongique du café (De Moraes et Luchese, 2003; Martins *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003), ce qui a conduit à une mauvaise identification des espèces qui sont en effet difficile à distinguer par leur morphologie uniquement. Dans cette étude, nous avons analysé la mycoflore du café en utilisant une approche moléculaire pour l'analyse globale de l'ADN des champignons isolés et présents dans les grains de café.

L'identification des moisissures basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ADN 28S ribosomique est devenu un outil puissant pour étudier les communautés des moisissures dans les échantillons environnementaux (Cocolin *et al.*, 2002a; Hesham *et al.*, 2006; Möhlenhoff *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008). La région de D1 du gène fongique 28S de l'ADNr a également été utilisée dans la caractérisation des profils de population fongique par Cocolin *et al.* (2002a) et El Sheikha *et al.* (2010). Ces auteurs ont montré que les méthodes d'identification moléculaire sont fine et précise, et donnent une identité fiable des souches étudiées.

Les principales moisissures isolées au cours de ce travail sont *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. citrinum*, *A. flavus*, *Mucor* sp., *F. chlamidosporum*, *Rhizopus nigricans*, *P. roqueforti*, *Scopuloriopsis* sp., *F. lacertarum*, *Rhizopus* sp., *Mucor hiemalis* et *A. tubigenis*. Tous ces genres fongiques ont déjà été enregistrés dans les analyses faites sur des grains de café mexicain, thaïlandais et brésilien (Mislivec *et al.*, 1983 ; Daivasikamani et Kannan, 1986; Abdel-Hafez et EL-EL-Maghraby, 1992; Roussos *et al.*, 1995). Parmi les espèces identifiées, certaines sont toxigéniques. Ce

sont : *A. Carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. citrinum* et *A. flavus* (Nelson *et al.*, 1983; Pitt et Hocking, 1997).

Dans le cadre de ce travail, il n'a pas été possible d'affecter un profil fongique à un type de traitement donné. Nos résultats se rapprochent de ceux de Noonim *et al.* (2008) qui dans ces analyses faites sur des grains de café traités par voie sèche, a obtenu des profils fongiques identiques aux étapes cerises de café sec et café vert, et où le profil était constitué de : *A. carbonarius*, *A. niger*, les *Aspergilli* des sections *Flavi*, *Terrei* et *Versicolores*, *Fumigati*, *Penicillium* sp. Mais pour ce qui est du traitement par voie humide, nos résultats diffèrent de ceux cités par la littérature pour la microflore fongique associée aux différents traitements de café (Silva *et al.*, 2000 ; Noonim *et al.*, 2008). Noonim *et al.* (2008) dans leurs travaux ont trouvé qu'au cours du traitement par voie humide, la flore fongique à l'étape de café en parche était constituée de *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *Penicillium* sp., les *Aspergilli* des sections *Flavi*, *Terrei* et *Versicolores*, *Cladosporium* sp. alors que dans le café vert, cette flore n'est constituée que de *A. westerdijkiae*, *A. niger*, *A. steynii*, *Penicillium* sp., *Eurotium* sp. Il apparaît donc que la biodiversité des souches fongiques présentes lors du traitement du café est très fortement liée au contexte géographique, écologique et humain (pratiques traditionnelles locales et conditions d'hygiène inégalement respectées).

Indépendamment de la campagne caféière et de la méthode employée pendant le traitement, les flores fongiques ne changent pas, mais on note une diminution substantielle du taux de contamination lorsqu'on passe de l'étape cerise de café/café en parche sec (55-100%) au café vert (40-72%). Suarez-Quiroz *et al.* (2004) a obtenu un résultat similaire sur une étude faite sur des grains de café mexicains ayant subi un traitement par voie sèche, voie humide et un traitement mécanique.

Les *Aspergillus* noirs (*A. niger* et *A. carbonarius*) représentent le groupe prédominant des moisissures isolées dans les échantillons de café Camerounais, et leur occurrence est beaucoup plus élevée que celle rapportée sur les grains de café brésilien ou vietnamien (Taniwaki *et al.*, 2003 ; Martins *et al.*, 2003 ; Leong *et al.*, 2007b). Selon Pitt et Hocking (1997), les *Aspergillus* entrent en compétition avec les genres *Fusarium* et *Penicillium* pour le même substrat, et leur incidence augmente dans les environnements ayant des températures élevées et de basse activité de l'eau ; qui sont là des conditions idéales retrouvées aux étapes finales du traitement du café notamment au cours du séchage et pendant le stockage. Cette forte contamination peut provenir du fait que, pendant le séchage les grains de café sont en contact direct avec l'air et le sol, source possible d'*A. carbonarius*. Et aussi des conditions d'aération de l'enceinte de stockage constitué des grilles placée tout au long des murs non loin du toit (le contrôle de la température ambiante est impossible dans ces conditions), et enfin des aléas climatiques.

II.4. Analyses en composantes principales des deux campagnes caféières

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension des relations existant entre les facteurs intrinsèques à la toxinogénèse (pourcentage de contamination totale en moisissure, pourcentage de contamination en *A. carbonarius*, *A. niger* et *A. ochraceus*) et la teneur en OTA des échantillons de café, les résultats expérimentaux ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales. Le principe de cette analyse est basé sur la corrélation entre les variables et les observations, pour lesquelles les axes virtuels générés (F1 et F2) sont linéairement corrélés. La Figure 24 présente la disposition des variables dans le système de composantes principales F1xF2. Cette représentation appelée cercle de corrélation montre que les axes F1 et F2 expliquent à eux seuls 58% des variations de la toxinogénèse des deux campagnes caféières respectivement. La première composante principale (F1) explique 34%

des variations observées et la seconde composante principale (F2) 24% des variations. F1 est représenté par les pourcentages de contamination en *A. niger*, en *A. carbonarius* et en OTA. L'axe F2 est représenté par le pourcentage de contamination en moisissures totales et en *A. ochraceus*. Les variables complémentaires précipitations et températures sont corrélées à l'axe F1 alors que, l'altitude et l'humidité relative sont corrélées aux deux axes.

On peut observer, d'après ce cercle de corrélation, une corrélation négative entre les pourcentages en *A. carbonarius* et *A. niger* et entre le pourcentage de contamination en moisissures totales et le pourcentage de contamination en *A. ochraceus*.

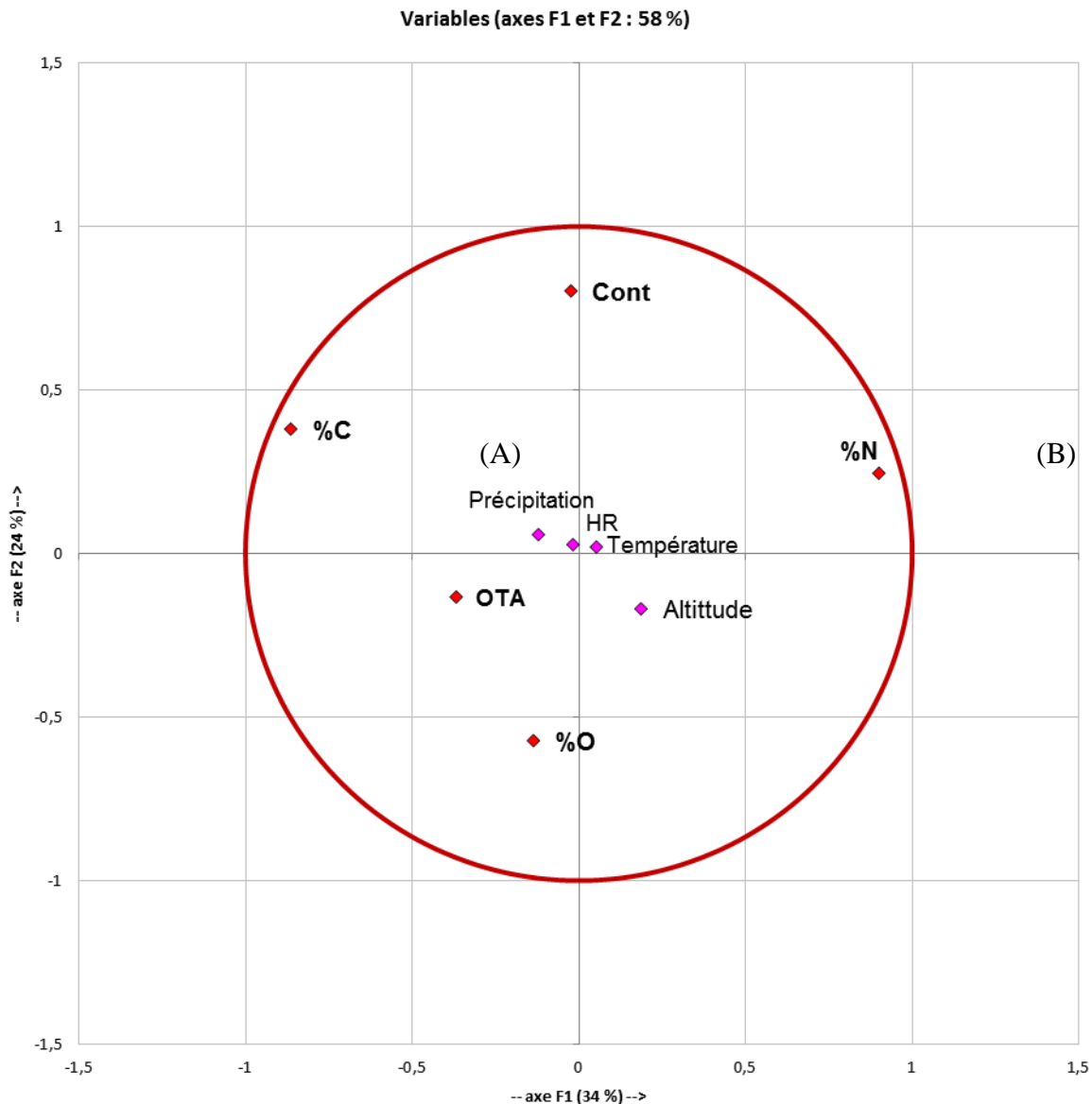


Figure 24 : Cercles des corrélations des différentes variables (cont : pourcentage de contamination en moisissures totale ; %C : pourcentage de contamination en *A. carbonarius* ; %N pourcentage de contamination en *A. niger* ; %O : pourcentage de contamination en *A. ochraceus* ; HR : humidité relative)

Les tableaux 15 et 16 permettent de ressortir les corrélations des variables entre elles, et avec l'ensemble des axes (F1, F2, F3, F4). Le tableau 15 montre que pour la composante principale F1, les variables les plus significatives sont: Les pourcentages de contamination en *A. niger* (90%) et en *A. carbonarius* (-86%). Concernant la composante principale F2, les variables les plus significatives sont: les pourcentages de contamination en *A. ochraceus* (-

57%) et en moisissures totales (80%). Sur l'axe F3 qui n'apparaît pas dans le cercle des corrélations, les pourcentages de contaminations en *A. ochraceus* (69%) et en OTA (-66%), sont significatives. L'axe virtuel F4 ne présente qu'une variable significative : la teneur en OTA (65%), par extension les variables associées ne présentent pas globalement des contributions significatives. Le tableau 16 quant à lui montre que, les variables pourcentages de contamination en *A. niger* et en *A. carbonarius* sont fortement corrélés (64%) ; le pourcentage de contamination en *A. ochraceus* est corrélé au pourcentage de contamination en *A. niger* (23%); et enfin le pourcentage de contamination en moisissures totales est corrélé au pourcentage de contamination en *A. carbonarius* (23%). Ces variables ont toutes une influence dans la toxinogénèse, mais *A. niger* et *A. carbonarius* représentent celles ayant un plus grand impact sur celle-ci.

Tableau 15 : Coordonnées des variables sur les quatres axes principaux

	F1	F2	F3	F4
Cont	-0,02	0,80	0,40	0,42
%N	0,90	0,25	-0,12	0,18
%C	-0,86	0,38	0,04	-0,16
%O	-0,14	-0,57	0,69	0,41
OTA	-0,37	-0,13	-0,66	0,65
Altitude	0,19	-0,17	-0,01	0,19
Température	0,05	0,02	0,06	-0,26
Précipitation	-0,12	0,06	0,04	-0,05
HR	-0,02	0,03	-0,05	0,09

Les chargements ayant une valeur absolue supérieure à 0,5 représentent une contribution significative.

Tableau 1 6: Corrélation entre les différentes variables

	Cont	%N	%C	%O	OTA
Cont	1	0,17	0,23	-0,03	-0,08
%N	0,17	1	-0,64	-0,23	-0,17
%C	0,23	-0,64	1	-0,11	0,14
%O	-0,03	-0,23	-0,11	1	-0,06
OTA	-0,08	-0,17	0,14	-0,06	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral)

La représentation des échantillons de café dans le système d'axe F1 x F2 est indiquée sur la figure 25. Cette figure permet de voir une distribution des échantillons de café le long des deux axes F1 et F2, témoignant ainsi d'une grande variation de ces échantillons suivant les variables de ces axes. La distribution des échantillons de café le long de ces axes permet de les classer en trois principaux groupes : le premier groupe est constitué des échantillons de café du genre Robusta (Ib) en cerise sèche, le second groupe est constitué des échantillons de café du genre Arabica (Ia) en parche sec et le dernier groupe est constitué des échantillons de cafés verts des genres Arabica et Robusta. Il ressort de ce regroupement que la contamination en OTA est associée au café Arabica en parche sec (Ia), ce qui rejoint le résultat obtenu lors de l'analyse des variances, qui a montré que le stade de prélèvement avait une influence significative sur la contamination en OTA, et que le traitement par voie humide accentuait cette contamination. Le café en parche sec (Ia) étant fortement corrélé au pourcentage de contamination en *A. ochraceus*, justifie ici le pourquoi de la baisse de la teneur en OTA des échantillons de café lorsqu'on quitte de l'étape café en parche pour le café vert, car divers auteurs (Frank, 1999 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004 ; Noonim *et al.*, 2008) ont montré que *A. ochraceus* produit plus d'OTA que *A. carbonarius* et *A. niger*.

II.5. Conclusion partielle

Cette deuxième partie du travail a montré que, le suivi microbiologique effectué sur des grains de café provenant des deux types de traitements post-récolte (voie sèche et voie humide) répartis sur deux campagnes caféières successives, a permis d'observer que le café est contaminé par les moisissures. *A. carbonarius* est la souche fongique qui la plus grande fréquence à Bafoussam et à Dschang ; alors que *A. niger* est l'espèce majoritaire à Bafang, Santchou et Melong. Le type de traitement post-récolte n'a pas montré d'influence significative sur la mycoflore, mais a une incidence sur le taux de contamination des grains.

Pour tous les sites, Les souches fongiques isolées appartiennent aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scopuloriopsis*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Aspergillus*, ce dernier genre incluant des souches potentiellement productrices d'OTA (*A. niger*, *A. carbonarius* et *A. ochraceus*). L'année de la campagne caféière n'a pas eu d'influence sur la qualité de la microflore fongique. *A. niger* et *A. carbonarius* sont les souches toxigènes les plus abondantes. De plus, la période de collecte et le stade de prélèvement des échantillons de café ont montré une influence sur la fréquence des souches isolées et les teneurs en OTA de ces derniers.

La biodiversité des souches fongiques présentes lors du traitement du café étant très fortement liée au contexte géographique, climatique, écologique et humain (pratiques traditionnelles locales), la maîtrise des moyens de lutte contre ces mycètes filamenteux par les acteurs de la filière, peut garantir la sûreté du café produit.

Bien que la caractérisation de la mycoflore ait été faite par les techniques classiques de microbiologie, il s'est cependant posé un problème durant cette étude, la technique classique d'isolement et de caractérisation est longue et laborieuse car de l'isolement à l'identification finale en passant par les diverses caractérisations environ deux semaines voir un mois peuvent

s'écouler. En plus certaines souches n'ont pas pu croître pendant les différentes séries de purification de souches. Il devient donc impératif d'utiliser une technique de culture indépendante permettant de ressortir le profil fongique du café le plus facilement possible sans passer par la culture sur boîtes de Pétri.

III. EVALUATION DE LA MYCOFLORE PAR PCR-DGGE

III.1. Vérification de la qualité de l'ADN extrait

Sur les gels de vérification de l'extraction des ADN, des bandes intenses et nettes sont observées dans les zones de hauts poids moléculaires, et des bandes moins intenses dans les zones de faibles poids moléculaires. La figure 26 montre la position des bandes de hauts poids moléculaires correspond à celles de fragments de plus de 16 kb qui sont sans doute de l'ADN génomique microbien combiné à de l'ADN génomique de moisissures. L'aspect des bandes obtenues rend compte d'une quantité suffisante d'ADN extrait qui permet de réaliser une amplification par PCR.

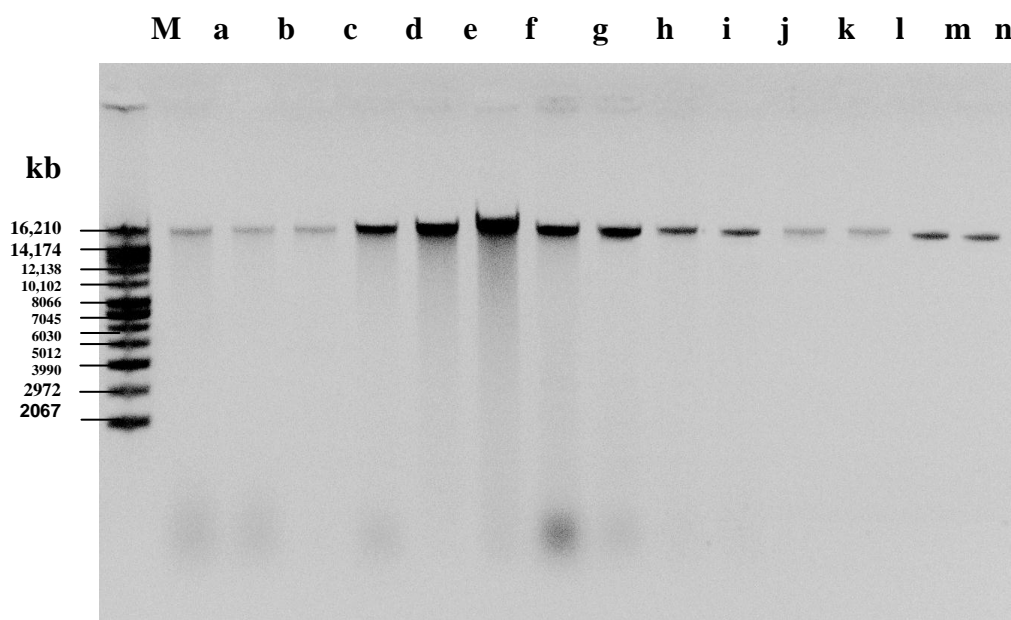


Figure 26 : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de la performance d'extraction de l'ADN des moisissures (M : marqueur, a-n : ADN des moisissures)

III.2. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La qualité de l'ADN a été confirmée par l'amplification par PCR avec succès de la région conservée des ADNr 28S fongiques. Les résultats de l'amplification par PCR par les amorces GC U1f, U2R de l'ADN des moisissures extraits des grains de café sont visibles sur les figures 27. Sur les gels d'agarose, les produits de PCR ont donné des bandes uniques, nettes et intenses d'environ 260 pb, ce qui correspond à la taille attendue pour les moisissures. Le témoin négatif a été réalisé avec le mélange réactionnel sans ajout d'ADN extrait. L'absence de bande pour le témoin négatif montre qu'il n'y a pas de contamination du mélange réactionnel de PCR. Les résultats obtenus montrent que la qualité et la quantité des ADN totaux extraits des moisissures sont bonnes et qu'aucun inhibiteur ne semble avoir une influence sur la réaction d'amplification. Les produits de PCR réalisés avec les ADN des moisissures extraits des grains de café sont ensuite analysés par DGGE.

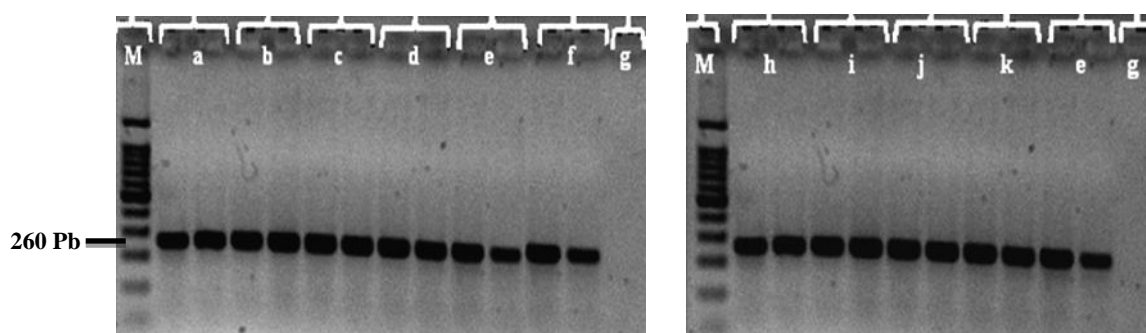


Figure 27: Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification par PCR de l'ADN des moisissures (M: marqueur 100pb; g: témoin négatif; a – e : ADN des moisissures)

III.3. Application de l'Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE) à l'analyse des moisissures

L'étude de la variation des distances de migration sur gel de DGGE de l'ADN de 7 espèces de moisissures, nous a montré une bonne séparation des amplicons (Figure 28). Mais on observe toutefois certaines bandes qui ont approximativement la même distance de migration, comme par exemple : *A. ochraceus* et *A. niger*. L'application de la technique PCR-DGGE permet donc d'analyser les moisissures en une seule étape

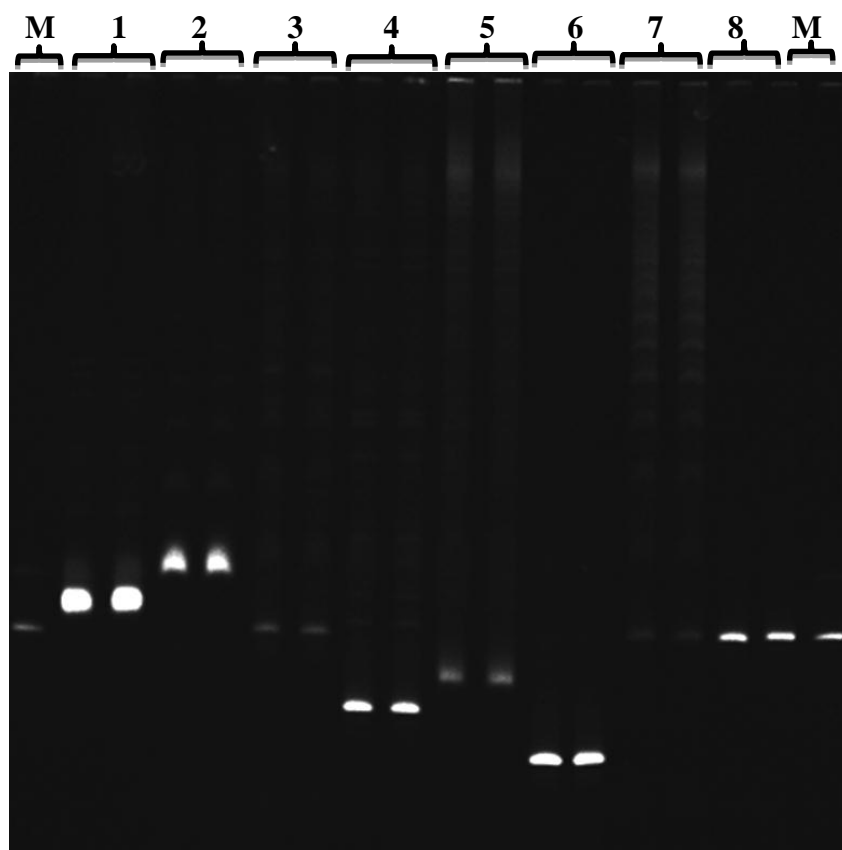


Figure 28 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des souches pures de moisissures isolées. M : marqueur (*A. niger*) ; 1 : *Cladosporium sphaerospermum*; 2: *Fusarium lacertarum*; 3: *A. ochraceus*; 4: *P. citrinum*; 5: *Rhizopus sp.*; 6: *A. oryzae*; 7: *A. niger*; 8: *A. niger*

Les photos des gels présentés aux figures 29 et 30, montrent que l'ADN des souches témoins *A. carbonarius* et *A. niger*, ont donné des bandes uniques situées aux positions attendues, confirmant ainsi le bon déroulement de la DGGE.

Sur les gels (Figures 29 et 30), on peut observer de 3 à 13 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt. Chaque ligne verticale représente un échantillon de café et chaque bande représente une moisissure. Les profils DGGE des grains cafés avec ou sans coques et ayant subi des traitements différents (voie sèche et voie humide), provenant de la même région sont différents entre eux et des profils des échantillons d'autres sites.

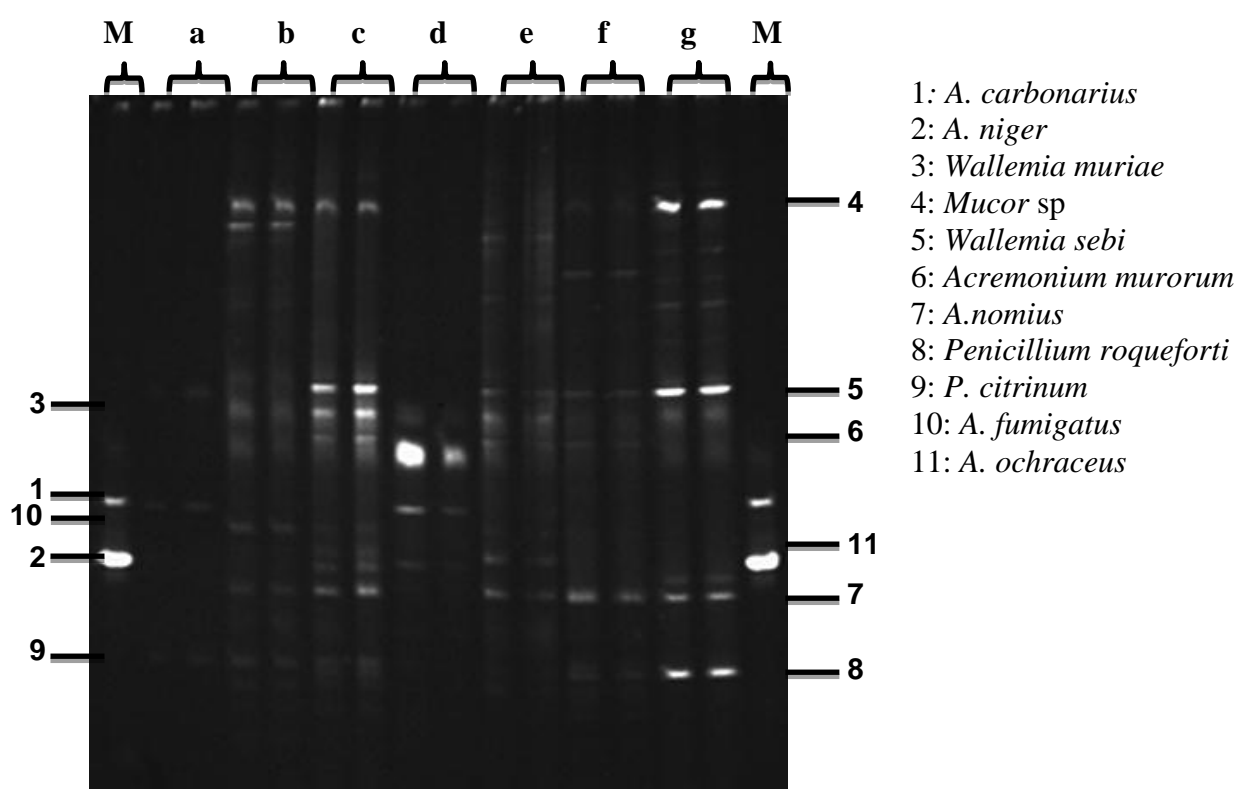


Figure 29: Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des moisissures des échantillons du café à différents stades de prélèvement : (M : marqueur ; a-g : échantillons de café (3709, 3409, 3910, 1209, 1710, 2710 et 2510)). Les espèces fongiques sont indiquées par les nombres correspondant à la position des bandes.

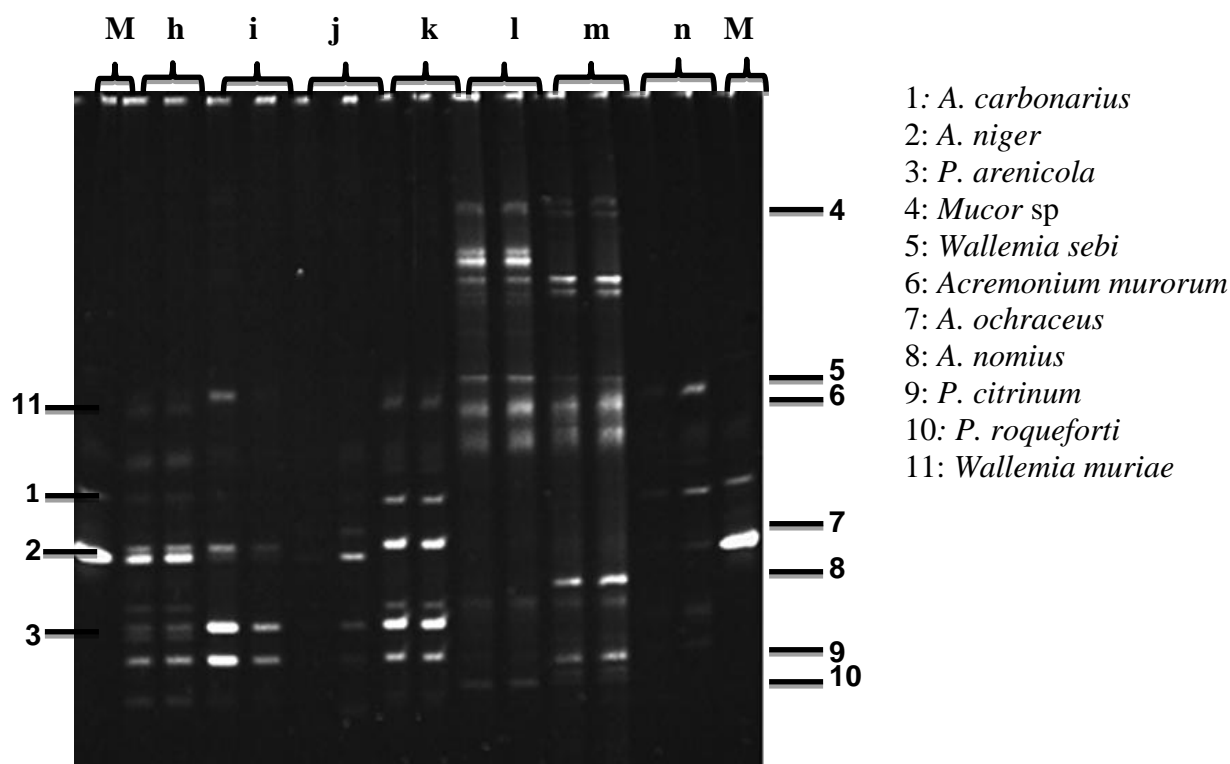


Figure 30: Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés des régions 28S de l'ADNr des moisissures des échantillons du café à différents stades de prélèvement : (M : marqueur ; h-n : échantillons de café (3410, 0510, 1210, 1110, 4210, 4010 et 0410)). Les espèces fongiques sont indiquées par les nombres correspondant à la position des bandes.

Le tableau 17 montre la comparaison des espèces dominantes identifiées au cours des traitements technologiques du café par les techniques culturales classique et par DDGE. De ce tableau il ressort que, la DGGE permet de mettre en évidence un plus grand nombre d'espèces fongiques. Les genres microbiens isolés par les méthodes culturales apparaissent bien sur les profils DGGE à quelques exceptions près (les genres *Rhizopus* et *Fusarium* n'ont pas pu être mis en évidence avec la méthode PCR-DGGE). En outre, il est important de signaler que par la PCR-DGGE, il n'a pas été possible d'avoir le profil fongique de tous les échantillons de café analysés, et certaines espèces présentes sur les profils obtenus par DGGE (*A. nomius* ; *A. fumigatus* ; *Wallemia muriae* ; *W. sebi* ; *Acremonium murorum* ; *P. arenicola*) sont absentes sur les profils obtenus par méthodes culturales et vis vers ça, ce qui fait ainsi ressortir la complémentarité des deux méthodes.

Tableau 17: Comparaison des espèces dominantes identifiées au cours des traitements technologiques du café par les techniques culturelles classique et par DDGE/séquençage.

Echantillons ^a	Espèces identifiées par techniques culturelles	Espèces identifiées par DGGE
Voie humide: stade I_a		
3409	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>P. roqueforti</i>	<i>A. nomius</i> ; <i>A. fumigatus</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>Wallemia muriae</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>Mucor sp.</i>
3709	<i>A. niger</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>Fusarium lacertarum</i>	<i>A. niger</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>W. sebi</i>
3410	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>P. citrinum</i>	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>Acremonium murorum</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>W. muriae</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. arenicola</i>
4210	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>F. lacertarum</i> ,	<i>Mucor sp.</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>Acremonium murorum</i>
Voie sèche: stade I_b		
1209	<i>A. carbonarius</i> ; <i>Rhizopus nigricans</i> ; <i>P. roqueforti</i>	<i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> ; <i>Acremonium murorum</i> ; <i>W. muriae</i>
0510	<i>A. niger</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>F. chlamidosporum</i>	<i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. arenicola</i> , <i>P. roqueforti</i>
0610	<i>A. niger</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>F. chlamidosporum</i>	//
1210	<i>A. niger</i> ; <i>F. lacertarum</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. arenicola</i> , <i>P. roqueforti</i>
1710	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>P. roqueforti</i>	<i>A. niger</i> ; <i>A. nomius</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>Acremonium murorum</i> ; <i>W. muriae</i>
2510	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>A. tamaritii</i>	<i>A. nomius</i> ; <i>w. sebi</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>Mucor sp.</i>
3810	<i>A. niger</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>P. citrinum</i>	//
1110	<i>A. carbonarius</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>Mucor hiemalis</i>	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>W. muriae</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. arenicola</i>
Voie sèche et voie humide: stade II		
0410	<i>A. niger</i> ; <i>R. nigricans</i> ; <i>M. hiemalis</i> ; <i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. arenicola</i>
2710	<i>A. carbonarius</i> ; <i>R. nigricans</i>	<i>A. nomius</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>Acremonium murorum</i> ; <i>Mucor sp.</i>
3910	<i>A. niger</i> ; <i>F. lacertarum</i> ; <i>mucor sp.</i>	<i>A. nomius</i> ; <i>A. fumigatus</i> ; <i>A. carbonarius</i> ; <i>A. ochraceus</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>W. muriae</i> ; <i>Mucor sp.</i>
4010	<i>A. carbonarius</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. tamaritii</i>	<i>A. nomius</i> ; <i>W. sebi</i> ; <i>P. citrinum</i> ; <i>P. roqueforti</i> ; <i>Acremonium murorum</i> ; <i>Mucor sp.</i>

^a numéro d'échantillon assigné pour le contrôle de laboratoire; **Ia, Ib, II**: stade de prélèvement.

III.3. Discussion

Après extraction de l'ADN des moisissures et leur amplification par PCR, les amplicons obtenus ont donné des bandes claires et distinctes d'une taille de 260 pb, ce qui rejoint les valeurs trouvées par de nombreux auteurs (Sandhu *et al.*, 1995 ; Möhlenhoff *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008 ; Khot *et al.*, 2009 ; El Sheikha et Montet, 2010 ; El Sheikha *et al.*, 2010). Ces résultats montrent que la qualité et la quantité des ADN totaux extraits des moisissures sont bonnes et qu'aucun inhibiteur ne semble avoir une influence sur la réaction d'amplification. De plus, Lessing (2005) a démontré qu'après amplification, si les amplicons produits donnent une seule bande de forte intensité, cela valide la qualité du gel et les conditions de migration. Parmi les bandes obtenues, certaines ont apparues plus intenses que d'autres, ce phénomène pourrait par ailleurs s'expliquer par la migration d'une faible quantité d'ADN.

Les profils de DGGE, ont permis de mettre en évidence la séparation distincte des différentes bandes. La réalisation des profils électrophorétiques peut donc être considérée comme une image de l'ensemble des moisissures présentes dans les échantillons de café analysés. De plus chaque bande discrète et individuelle présente sur les gels se rapporte à un unique phylotype (souche ou clone) (Muyzer *et al.*, 1993 ; Van Hannen *et al.*, 1999). Une des caractéristique forte de la DGGE est la possibilité d'identifier les membres des communautés par le séquençage et la ré-amplification des bandes excisées directement à partir des gels ou par analyse d'hybridation avec des sondes spécifiques (Mc Cracken *et al.*, 2001; Temmerman *et al.*, 2003).

Masoud *et al.*, 2004 dans leurs travaux sur l'étude des levures impliqués dans la fermentation du café arabica en Afrique de l'Est, déterminé par génotypage et par PCR-DGGE, ont démontré que la méthode PCR-DGGE est une méthode rapide et efficace pour

décrire les communautés de champignons de café. Dans notre cas, nous avons montré que pour le même échantillon analysé avec des techniques traditionnelles et avec la PCR-DGGE, les profils obtenus par DGGE ont montré une plus grande diversité microbienne. Ceci confirme l'idée avancée par Laforgue *et al.* (2009) qui ont montré que la PCR-DGGE a été une méthode efficace et rapide pour suivre les communautés fongiques des produits alimentaires. En fait, il est probable que la limite de détection d'une espèce dans un mélange résulte de la combinaison du niveau de la population totale, le nombre d'espèces et de sa concentration spécifique dans le mélange. El Sheikha *et al.* (2010) ont montré dans leurs travaux qu'il faut environ une concentration de 10^3 spores/mL d'échantillon pour réussir une amplification par PCR des moisissures. Il paraît donc important de noter que l'absence d'une espèce représentée par une bande détectable sur un gel de DGGE après analyse directe, ne signifie pas nécessairement son absence dans l'échantillon.

Bien que la méthode PCR-DGGE ait souvent été utilisée pour l'analyse des communautés microbiennes, elle rencontre encore quelques inconvénients tels que la détection d'ADN résiduel appartenant à une espèce qui était présente à un certain stade sur les grains de café, mais qui ont disparu ou ne peuvent pas être cultivées dans des conditions standard de laboratoire, réduisant ainsi l'efficacité d'analyse des communautés fongiques. Malgré ces limites, la technique DGGE est fortement préférée et est considérée comme l'une des meilleures techniques de surveillance de la communauté fongique d'un aliment d'une manière globale, rapide et reproductible (El Sheikha *et al.*, 2010).

III.4. Conclusion partielle

Les résultats d'analyses obtenus par la méthode PCR-DGGE ont permis d'avoir une plus grande diversité fongique, contrairement à la caractérisation par les techniques culturales. L'absence de espèces des genres *Rhizopus* et *Fusarium* dans les profils obtenus par PCR-

DGGE ; et des espèces suivantes : *A. nomius* ; *A. fumigatus* ; *Wallemia muriae* ; *W. sebi* ; *Acremonium murorum* ; *P. arenicola* présentent sur les profils DGGE et absentes des profils obtenus par méthodes culturales classiques, ont permis de ressortir la complémentarité des deux techniques d'analyse des communautés microbiennes, mais l'approche moléculaire à l'avantage de la rapidité et de la spécificité.

La présence de plusieurs bandes DGGE représentant les profils fongiques des grains de café, ont montré une homologie d'environ 97% avec ceux des banques de données (GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases)). Cette méthode de culture-indépendante, apparait donc comme un complément utile aux méthodes de culture classiques pour caractériser complètement les microflore fongiques présentes à différent stade du processus de traitement du café.

Des auteurs ont montré dans leurs travaux que les profils microbiens obtenus par PCR-DGGE peuvent être utilisés pour remonter l'origine géographique des denrées alimentaires. Ce travail ayant été effectué sur des échantillons de café provenant de cinq sites différents, il serait judicieux de voir si cet outil moléculaire (PCR-DGGE) peut être utilisé comme un outil de traçabilité pouvant permettre de remonter l'origine de ces échantillons.

IV. APPLICATION DE LA PCR-DGGE A LA DETERMINATION DE L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE DU CAFE

IV. 1. Influence des sites et des traitements sur le profil DGGE

Les échantillons de café analysés viennent des régions de l'Ouest (Baffoussam, Bafang, Dschang et Santchou) et de la plaine du littoral (Melong). Le tableau 18 donne les caractéristiques des échantillons utilisés pour cette analyse comparative. Les échantillons de café ont été groupés en fonction du type de traitement appliqué (traitement par voie humide et par voie sèche), de l'étape du procédé (coque, parche et café vert), et du site de prélèvement.

La photo du gel présenté à la figure 31, montre que l'ADN des souches témoins *A. carbonarius* et *A. niger* a donné des bandes uniques situées aux positions attendues, confirmant ainsi le bon déroulement de la DGGE. De plus, l'analyse du profil DGGE révèle la présence de 5 à 13 bandes qui représentent les microorganismes présents dans les échantillons de café. De cette analyse il ressort que, chaque site a un profil fongique qui lui est caractéristique, et malgré le fait que le type de traitement influence sur la population fongique, il y'a des bandes qui sont communes aux échantillons de café provenant de tous les sites, ceux-ci peuvent constituer des marqueurs biologiques potentiels pour assurer la traçabilité du café du Cameroun.

Tableau 18 : Caractéristiques des échantillons utilisés pour la comparaison des profils fongiques obtenus par PCR-DGGE.

Référence	Marqueur (M)	3410	0610	1409	41/9	3109	2710	2510	0909	3110	4810	5110
Type		P	V	P	V	V	V	C	V	C	V	C
Variété		A	R	A	R	R	R	R	R	R	R	R
Traitement		VH	VS	VH	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS
		VHD	VSD	VHB	VS1B	VS1B	VSS	VS1S	VSA	VS1A	VSM	VS1M
Site		DSH		BFSS			SAN		BAF		MEL	

P : parche ; V : vert ; C :coque ; A : arabica ; R : robusta ; VH : voie humide ; VS : voie sèche ; DSH : Dscang ; BFSS : Bafoussam ; SAN : Sanchou ; BAF : Bafang ; MEL : Melong

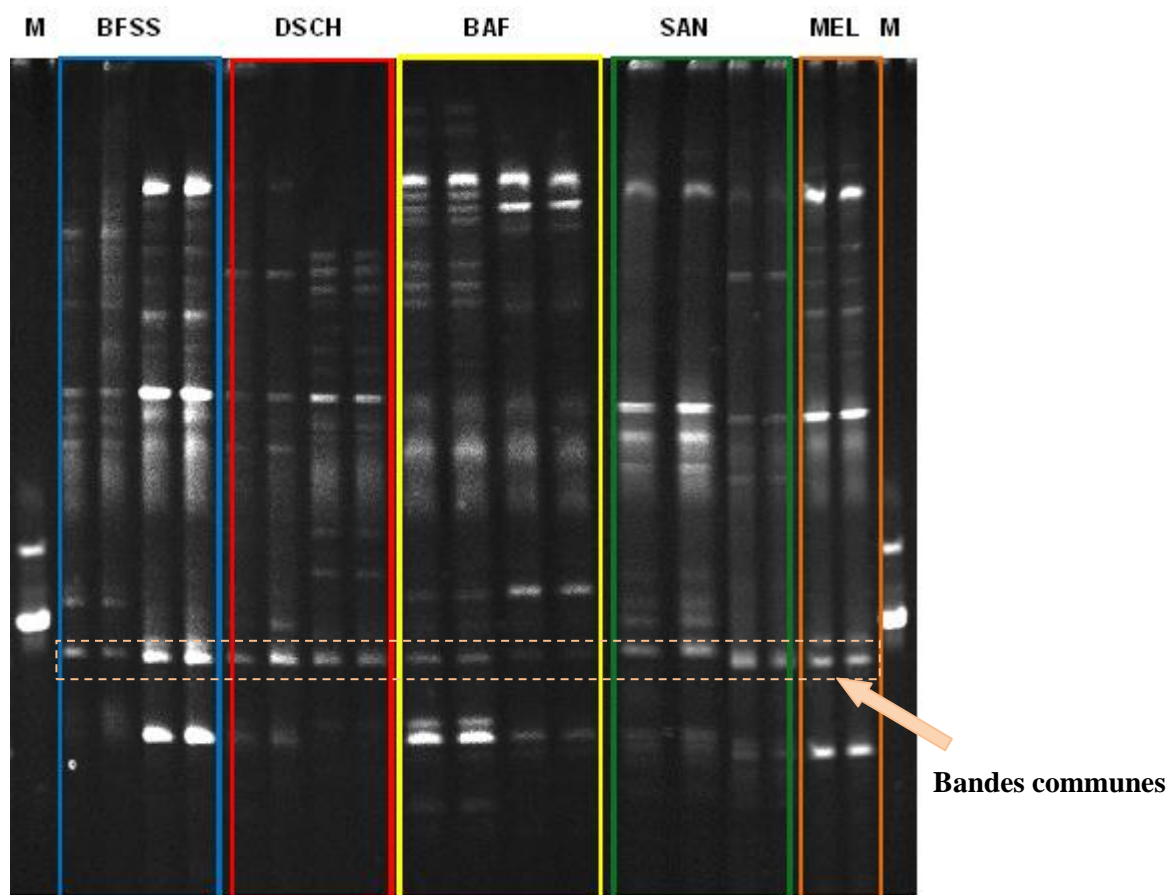


Figure 31 : Photo du gel DGGE d'ADN des moisissures extraites des cafés des différents sites et ayant subi deux types de traitement : Voie sèche et Voie humide.

Les indices de similarité de Dice calculés grâce aux matrices issues de l'observation du gel DGGE ont montré que les profils obtenus à partir d'ADN extraits du café de Dschang sont proches de ceux de Bafoussam, et les profils de Melong sont très proches de ceux de Santchou, mais seul Bafang a un profil différent des autres sites de collecte.

D'autre part, la construction du dendrogramme a permis d'obtenir la figure 32. Cette dernière révèle la formation de deux principaux clusters à 17% de similarité : le premier est formé des échantillons de Santchou, Bafang et de Melong tandis que le second est formé des échantillons de Bafoussam et de Dschang. A 44,5% de similarité, deux clusters secondaires se sont formés entre les échantillons de Bafang et ceux de Melong démontrant par là même leur rapprochement.

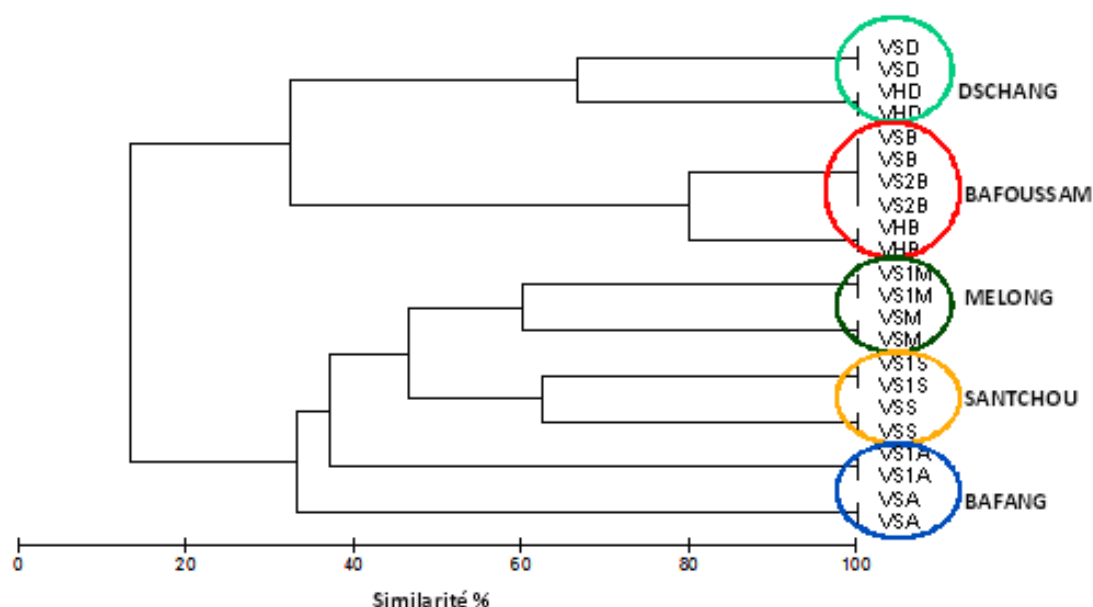


Figure 32: Dendrogramme des profils DGGE d'ADN des moisissures extraites des cafés ayant subi deux types de traitement (voie sèche, voie humide) et prélevé dans 5 sites différents.

IV. 2. Discussion

La détermination de l'origine géographique est une exigence de la traçabilité lors de la transaction commerciale des produits alimentaires. Retracer la source d'un produit consiste à analyser de façon globale les communautés fongiques sur les échantillons de denrées alimentaires. Ceci est basé sur l'hypothèse que, l'environnement a un effet sur l'écologie microbienne des aliments. Les différences observées entre les profils peuvent être attribuées à des différences environnementales entre les sites de collecte. De plus, la réduction du nombre de bandes dans un même site pour deux traitements différents, ou pour un même traitement mais à des stades de process différent, peut être attribué au fait que lorsqu'on quitte de l'étape cerise sèche ou café en parche sec pour le café vert, on a une réduction de la charge microbienne, car une bonne partie des microorganismes présents sur le café est éliminée avec le dépulpage (FAO, 2006). Et pour qu'une bande puisse apparaître sur un gel, il faut environ une concentration de 10^3 spores/mL d'échantillon pour réussir une amplification par PCR des

moisissures (El Sheikha *et al.*,2010). Il est donc important de noter que l'absence d'une espèce représentée par une bande détectable sur un gel de DGGE après analyse directe, ne signifie pas nécessairement son absence dans l'échantillon.

La méthode PCR-DGGE a été utilisée pour relier la communauté des moisissures à l'origine géographique du café. Dans cette étude on a constaté que le site de prélèvement a une influence remarquable sur les différents profils fongiques obtenus par PCR-DGGE. Une similarité plus forte existe entre les profils fongiques de Dschang et de Bafoussam, ainsi qu'entre ceux de Santchou et de Melong bien que ceux-ci soient distancés approximativement de 48 km et de 33km respectivement. Ce qui pourrait s'expliquer soit par la proximité des deux sites de prélèvement, soit par leurs conditions climatiques voisines (altitude, pluviométrie) car Santchou et Melong sont situés dans les plaines, alors que Bafoussam Dschang sont sur les plateaux de l'Ouest. Ce résultat corrobore celui de El Sheikha *et al.* (2010) qui dans leur étude faite sur les échantillons de karité et de physalis égyptien, ils ont montré que les différences dans les profils microbiens sont attribuées à des différences liées à l'environnement entre les régions, les régions proches géographiquement ont des caractéristiques environnementales voisines, et ces différences entre les régions où ont été collecté les fruits soumis à leur étude, ont eu un effet majeur sur la communauté fongique. Les types de système de traitement appliqué pourraient également influencer sur les communautés microbiennes du café, mais ces derniers n'ont pas montré une influence sur le regroupement des échantillons en fonctions de leur site de collecte lors de la construction du dendrogramme.

En fait lors de la comparaison statistique des gels DGGE des différents sites d'échantillonnage du café, nous avons pu constater une correspondance complète obtenue entre les zones géographiques et les communautés fongiques. Nous pouvons donc conclure que le site où le café a été récolté a un effet majeur sur la communauté microbienne de ce

dernier. L'on peut donc établir un lien statistique entre les populations fongiques et la zone géographique de collecte des échantillons de café. De plus il a été montré dans le cadre de ce travail que, pour un même site on a des bandes communes, celles-ci peuvent être utilisées comme marqueur biologique pour assurer la traçabilité du café. Et comme les champignons peuvent résister à des conditions plus extrêmes que les bactéries (Ros Chumillas *et al.*, 2007) et ont un plus faible taux de mutation par rapport aux bactéries et aux virus (Drake *et al.*, 1998), ils peuvent donc être des marqueurs environnementaux potentiellement meilleurs que les bactéries. En effet, les parois des champignons sont composées essentiellement de glucanes dans une conformation en triple hélices. Ces chaînes complexes sont associées avec d'autres polymères pariétaux (liaison covalente avec la chitine et les galactomananes) qui constituent la rigidité des parois des champignons.

IV. 3. Conclusion partielle

Le but de cette étude était d'évaluer par l'utilisation de la technique PCR-DGGE l'effet des sites sur le profil fongique des échantillons de café. Il ressort de ces travaux que grâce à la PCR-DGGE, il a été possible d'affecter des profils à chaque site ; et que les bandes communes à tous les sites pourraient constituer des marqueurs biologiques permettant de remonter l'origine géographique du café. Ces marqueurs biologiques étant spécifiques pour les échantillons de café provenant d'une même localité, permettent de les distinguer statistiquement.

Cette technique (PCR-DGGE) est plus rapide (24 h) que l'ensemble des techniques microbiologiques classiques et évite l'analyse précise de champignons par biochimie ou en biologie moléculaire (séquençage). Cette méthode peut donc être proposée comme un outil de traçabilité analytique rapide pour le café et peut permettre de construire une banque de données utile à la construction de la cartographie du profil fongique du café camerounais.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail a été de déterminer les teneurs en OTA du café par dosage chromatographique, d'identifier et de mettre en œuvre une méthode utilisant la PCR-DGGE pour analyser la totalité des flores fongiques présentes sur les échantillons de café en une seule analyse et assurer la traçabilité de ces derniers.

L'évaluation de la contamination en OTA des grains de café des campagnes caféières 2009 et 2010 révèlent que le type de traitement post récolte (voie sèche et voie humide) affecte significativement la toxinogénèse ; après le séchage et quel que soit le type de process, le taux de contamination par les souches toxigènes est relativement élevé. Chaque fois qu'un échantillon a présenté une forte teneur en OTA, une souche toxigénique (*A. carbonarius* en particulier) a été isolée, ce qui montre que la présence d'une souche fortement productrice peut constituer un risque non négligeable de contamination en OTA. Bafoussam et Dschang sont les sites les plus contaminés en OTA, mais de façon générale, les échantillons de café provenant des cinq sites de notre étude ont des teneurs en OTA non inquiétante pour les consommateurs et même, ne saurait constituer une barrière pour son exportation.

Les analyses mycologiques des grains de café des deux types de traitements post-récolte répartis sur deux campagnes caféières successives, révèlent une forte contamination par les moisissures. *A. carbonarius* est la souche fongique qui la plus grande fréquence à Bafoussam et à Dschang ; alors que *A. niger* est l'espèce majoritaire à Bafang, Santchou et Melong. Le type de traitement post-récolte n'a pas une influence significative sur la microflore fongique, mais a une incidence sur la fréquence de contamination fongique des grains. Quelque soit le site de prélèvement, Les souches fongiques isolées se répartissent en sept genres : *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Aspergillus*, ce dernier genre incluant des souches potentiellement productrices d'OTA (*A. niger*, *A. carbonarius* et *A. ochraceus*). L'année de la campagne caféière n'a pas

d'influence sur la qualité de la microflore fongique. *A. niger* et *A. carbonarius* sont les souches toxigènes les plus abondantes. De plus, la période de collecte et le stade de prélèvement des échantillons de café ont montré une influence sur la fréquence des souches isolées et les teneurs en OTA de ces derniers.

La technique PCR-DGGE a été utilisée pour matérialiser la présence de micro-organismes viables et non viables. A l'issue de cette étude, on a obtenue une plus grande diversité fongique, contrairement à la caractérisation par les techniques culturales. L'absence de espèces des genres *Rhizopus* et *Fusarium* dans les profils obtenus par PCR-DGGE ; et des espèces : *A. nomius* ; *A. fumigatus* ; *Wallemia muriae* ; *W. sebi* ; *Acremonium murorum* ; *P. arenicola* présentent sur les profils DGGE et absentes des profils obtenus par méthodes culturales classiques, ont permis de ressortir la complémentarité des deux techniques d'analyse des communautés microbiennes, mais l'approche moléculaire à l'avantage de la rapidité et de la spécificité.

La technique PCR-DGGE a également été utilisée comme outil de traçabilité pour remonter l'origine de nos différents échantillons de café. Grâce à cet outil, il a été possible d'affecter des profils à chaque site ; et de montrer que les bandes communes à tous les sites constituent des marqueurs biologiques qui pourraient permettre de remonter l'origine géographique du café. Ces marqueurs biologiques étant spécifiques pour les échantillons de café provenant d'une même localité, ils permettent de distinguer statistiquement les régions.

Cette technique a l'avantage d'être plus rapide que l'ensemble des techniques utilisées en microbiologie classique et permet d'éviter l'analyse précise des champignons par biochimie ou en biologie moléculaire (séquençage). La PCR-DGGE est donc proposée comme un outil de traçabilité analytique rapide pour le café, et peut être employé par un pays pour l'établissement d'une cartographie du profil fongique des différentes zones de

production du café. Cette technique a en outre été validée sur d'autres matières premières (le bois, la noix du Brésil, le poisson) ou d'autres contaminations (bactéries présentes sur des insectes ravageurs).

Perspectives

A l'issue de ce travail de thèse, plusieurs autres points auraient mérité d'être soumis à l'investigation, ce qui nous permet de présenter quelques perspectives pour la suite des études à mener.

- ❖ Le même travail devrait être mené en fonction des zones agro-écologiques où est produit le café, afin de ressortir le problème dans toutes les localités au Cameroun,
- ❖ Une observation de l'effet environnemental sur la pérennité des marqueurs sur au moins 3 années consécutives serait utile,
- ❖ La mise sur pied d'un système HACCP pour réduire les risques de contamination en OTA dans la filière café au Cameroun serait bénéfique pour la filière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Hafez A.I.I., EL-Maghraby O.M.O. (1992).** Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. *Cryptogamie Mycology*, 13:31–45.
- Aboul-Enein H.Y., Banu O., Altiokka G., Tunçel M.A. (2002).** A modified HPLC method for the determination of ochratoxin A by fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 16: 470-474.
- Adams S. M. (2002).** *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. Editors, Blackwell Science Ltd.: London, GB. p 252.
- Aguilera A., Souza-Egipsy V., Gómez F., Amils R. (2006).** Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment. Rio Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology*, 53: 294-305.
- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. F. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Amaral Zettler L. A., Gomez F., Zettler E., Keenan B. G., Amils R., Sogin M. L. (2002).** Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417:137.
- Araguàs C., González-Penas E., Lopez de Cerain A., Bello J. (2003).** Acerca de la posible contaminación por ocratoxina a en alimentos I : cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la comunidad foral de Navarra. *Alimentaria*, 1: 23-29.
- Arunga R. O. (1973).** Enzymatic fermentation of coffee. *Kenya Coffee*, 38: 354-357.
- Avallone S., Guiraud J.P., Guyot B., Olguin E., Brillouet J.M. (2001).** Fate of Mucilage Cell Wall Polisaccharides during Coffee Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5556-5559.

- Avallone S., Brillouet J.M., Guyot B., Olguin E., Guiraud J.P. (2002).** Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 191-198.
- Bailly H., Sallée B., García-García S. (1992).** El mejoramiento de la Calidad del Café en la Zona Xalapa-Coatepec (México). *Café Cacao Thé*, 36: 55-56.
- Balzer H. H. (2001).** Acids in Coffee, in *Coffee Recent Developments*. Clarke R. J. & Vitzthum O. G., Editors, Blackwell Science Ltd.: London GB. pp. 18-32.
- Barel M., Jacquet M. (1994).** La qualité du café: ses causes, son appréciation, son amélioration. *Plantations, recherche, développement*, 1: 5-13.
- Barszczewski W., Robak M. (2004).** Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, 21: 227-231.
- Beretta B., De Domenico R., Gaiaschi A., Ballabio C., Galli C.L., Gigliotti C., Restani, P. (2002).** Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*, 19: 70-75.
- Blateyron L., Michel G., Delteil D. (2001).** Des contaminants dans le vin: l'ochratoxine A. Rapport ICV.
- Boorman G. (1989).** NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies on ochratoxin A. NIH Publication No. 89-2813, US department of health and human services: Research Triangles Park, NC.
- Bordas E., Bretter E., Costin L., Lenghel L. (1973).** Etude épidémiologique de la néphropathie. *Review and Epidemiology Médecin*, 21: 481- 498.

Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1156-1159.

Bradbury A. G. W. (2001b). Chemistry I: Non-Volatile Compounds 1A: Carbohydrates, in Coffee Recent Developments. Clarke R. J. & Vitzthum O. G., Editors, Blackwell Science Ltd.: London, GB. pp. 1-17.

Brock T. D. (1987). The study of microorganism in situ: progress and problem. *Symposium of Society for General Microbiology*, 41: 1-17.

Bruns T. D., Fogel R., White T. J., Palmer J. D. (1989). Accelerated evolution of a false-truffle from a mushroom ancestor. *Nature*, 339: 140-142.

Buchanan R.L., Tice G., Marino D. (1981). Caffeine inhibition of ochratoxin A production. *Journal of Food Science*, 47: 319-321.

Bucheli P., Kanchanomai C., Meyer I., Pittet A. (2000). Development of Ochratoxin A during Robusta (*Coffea canefora*) Coffee Cherry Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4): 1358-1362.

Bünger J., Westphal G., Monnich A., Hinnendahl B., Hallier E., Müller M. (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 202: 199-211.

Burdaspal P.A., Legarda T.M. (1998). Ochratoxina A en muestra de café comercializado en España. *Alimentaria*, 1: 31-35.

Burdaspal P.A., Legarda T.M. (1999). Ochratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, 1: 107-113.

Burns J., McQuillan M., Najran P., Woolfe M. (2004). DNA techniques for tackling food misdescription. *European Food & Drink Review*, 1: 23-25.

Bytof G., Selmar D., Schieberle P. (2000). New Aspects of Coffee Processing: How do the Different Post-Harvest Treatments Influence the Formation of Potential Flavour Precursors? *Journal of Applied Botany*, 74: 131-136.

Cabrera H. A. P., Taniwaki M. H., Menezes H. C., Iamanaka B. T., Salgado S. A. (2001). Ochratoxin A Production by *Aspergillus ochraceus* in Raw Coffee as Affected by Alternating Temperatures and Different Water Activity Values. In *19th ASIC Coffee Conference*, Trieste, Italy, 14-18.

Cairns-Fuller V., Aldred D., Magan N. (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology*, 99:1215-1221.

Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines contaminants omnipresents dans l'alimentation animale et humaine. *La sécurité alimentaire du consommateur*. Moll, Editor, Lavoisier Tec.& doc. p 154

Castella, G., Larsen, T.O., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., Färber, P., Geisen, R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic Applied in Microbiology*. 25: 74-83.

Cebeci Z., Alemdar T., Guney O. I. (2008). Designing a Conceptual Production Focused and Learning Oriented Food Traceability System. In *Proc. of 4th Int. Conf. On Information and Communication Technologies in Bio and Earth Sciences*, (Ed. T. Tsiligiridis). (ISBN 978-960-387-725-7). 18-20 Sep 2008, Agric. Univ. Of Athens, Greece. pp 206-213.

Champaud (1972). « villes de l'Ouest du Cameroun ». Genèse et typologie des villes de l'Ouest du Cameroun, cahier ORSTOM, *Sciences Humaines*. (3) p.2.

Charrier A., Berthaud J. (1975). Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé*, 19: 251-263.

Chernozemsky I.N., Stoyanov I.S., Petkova-Bocharova T.K., Nicolov I.G., Draganov I.G., Stoichev I., Tanchev Y., Naidenov D., Kalcheva N.D. (1977). Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district. *Bulgaria international journal of cancer*, 19: 1-11.

Chiavaro E., Lepiani A., Colla F., Bettoni P., Pari E., Spotti E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. *Food Additives and Contaminants*, 19: 575-581.

China B., Clinquart A., Daube G. (2004). Développement d'un système de traçabilité génétique chez le porc basé sur le séquençage de régions riches en SNP. *Conference Proceedings (Journées Recherche Porcine)*, 36: 289-292.

Clifford M.N. (1991). Tannins in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food Chemistry*, 40: 191-200.

Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C., Comi G. (2002a). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12: 407– 411.

Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 83-91.

Coste R. (1995). L'usinage des cafés verts, in Les caféiers et les cafés dans le monde. Tome I. "Les caféiers". Larose (Eds): Paris. pp. 381.

Contentin J., Delaveau P. (2010). *Café, thé, chocolat Les bienfaits pour le cerveau et le corps*. Editeur : Odile Jacob (Paris), 272 p.

D'Mello J.P.F., MacDonald A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155 - 156.

Daivasikamani S., Kannan N. (1986). Studies on post-harvest mycoflora of coffee cherry of Robusta. *Journal of Coffee Research*. 16 (3, 4): 102–106.

Dall'Asta C., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. (2004). Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatographic A*, 1024: 275-279.

De Moraes MHP, Luchese RH. (2003). Ochratoxin A in coffee: influence of harvest and drying processing procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5824–5828.

Delage N., d'Harlingue A., Colonna Ceccaldi B., Bompeix G. (2003). Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food control*, 14: 225-227.

Dewettinck T., Hulsbosch W., Van Hege K., Top E. M., Verstraete W. (2001). Molecular fingerprinting of bacterial population in ground water and bottled mineral water. *Applied Microbial Biotechnology*, 57: 412-418.

Díez B., Pedrós-Alio C., Massana R. (2001b). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2932-2941.

Díez B., Pedrós-Alio C., Marsh T. L., Massana R. (2001a). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic

assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2942-2951.

Domijan A.M., Peraica M., Miletic-Medved M., Lucic A., Fuchs R. (2003). Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in urine. *Journal of Chromatography B*, **798**: 317-321.

Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J. F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*, 148: 1667-1686.

Duris D, Mburu JK, Durand N, Clarke R, Frank JM, Guyot B. (2010). Ochratoxin A contamination of coffee batches from Kenya in relation to cultivation methods and post-harvest processing treatments. *Food Additives and Contaminants*, 27: 836–841.

Edwards S.G., O’Callaghan J., Dobson A.D.W. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research*, 106: 1005 – 1025.

El Sheikha A.F., Condur A., Métayer I., Le Nguyen D.D., Loiseau G., Montet D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. *Yeast*, 26: 567-573.

El Sheikha AF, Métayer I, Montet D. (2010). A Biological bar-code for determining the geographical origin of fruit by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: an application to Physalis fruits from Egypt. *Food Biotechnology*, 25: 115-129.

El Sheikha AF, Montet D. (2010). Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: An application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits*, 65 (4): 255-265.

El Sheikha, A.F. (2010). Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. *Journal of Life Sciences*, 4: 9-15.

Engelhardt G., Ruhland M., Wallnöfer PR. (1999). Metabolism of mycotoxins in plants. *Advanced Food Science*, 21: 71-78.

Ercolini D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297-314.

Ercolini D., Hill P.J., Dodd C.E.R. (2003a). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 3540-3548

Eskola M. (2002). Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in finnish cereals: occurrence and analytical techniques. *EELA Julkaisuja Publications*, 3: 1-78.

FAO/WHO (2001). fifty-sixth meeting: evaluation of certain mycotoxins that contaminate food. Geneva , Switzerland, 6-15 february, p34.

Farah A., Donangelo C.M. (2006). « Phenolic compounds in coffee ». *Journal of Plant Physiology*, 18(1): 23-36

Fazoli S. Marzotto M. Rizzotti L. Rossi F. Dellagilo F., Torriani S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 59-70.

FEHD Report (2006). LegCo Panel (9 may) LegCo Panel on Food Safety and Environmental Hygiene (Hong Kong). <http://legco.gov.hk/yr05-06/english/panels/fseh/paper/fe0509cb2-1905-04-e.pdf>

Ferrier D. (1996). La protection des consommateurs. Dalloz, Paris, 120 p.

Fisher S.G., Lerman L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 80: 1579-1583.

Follmann W., Hillebrand I.E., Creppy E.E., Bolt H.M. (1995). Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and α . *Archive of Toxicology*, 69: 280-286.

Frank J.M. (1999). Le Système HACCP et son rôle possible dans la maîtrise des mycotoxines: évaluation de l'ochratoxine A dans la production de café. In Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines, Tunis, Tunisie. 3-6 mars pp. 1-13.

Frank J.M. (2001). On the Activity of Fungi in Coffee in Relation to Ochratoxin A Production. In *19th ASIC Coffee Conference*, Trieste, Italy. 14-18 May.

Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Rorestier N., Teyssier-Cuvelle S., Gillet F., Aragno M., Rossi P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns: A review. *Environmental Microbiology*, 4: 634-643.

Full G. Lonzarich V., Suggi-Liverani F. (1999). Differences in Chemical Composition of electronically sorted Green Coffee Beans. In *ASIC, 18e Colloque*, Helsinki, Finland. p 35-42.

Füzesi I., Mezoszentgyorgyi D., Herdon M. (2009). Application of modern traceability systems and data storage technologies by Hungarian meat companies. In: 4th Aspects and Visions of Applied Economics and Informatics. March 26 - 27. Debrecen, Hungary.

Garcia R., Arriola D., Arriola M.C.d., Porres E d., Rolz C. (1991). Characterization of Coffee Pectin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 24: 125-129.

Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., Van Elsas J.D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiological methods*, 38: 1-15.

GeoTraceAgri (2005). Geotraceability: an innovative concept for the qualification of crop production. Rapport final du projet GeoTraceAgri (GTA) IST-2001-34281. http://www.geotraceagri.net/doc/GeoTraceAgri_Finalreport_EN.pdf

Gimeno A. (2000). Micotoxinas, introduction. XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. <http://www.engormix.com>.

Golan E, Krissoff B., Kuchler F., Nelson K., Price G., Calvin L. (2003). Traceability for Food Safety and Quality Assurance: Mandatory Systems Often Miss the Mark. *Current Agr., Food, & Resource Issues*, 4: 27-35.

Golan E., Krissoff B., Kuchler F., Nelson K., Price G., Calvin L. (2004). Traceability in the U.S. Food Supply: Economic Theory and Industry Studies. Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Economic Report No. 830. March.

Gomes N.C.M., Fagbola O., Costa R., Rumjanek N.G., Buchner A., Mendona-Hagler L., Smalla K. (2003). Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3758–3766.

González L., Juan C., Soriano J.M. Molto J.C., Manes J. (2006). Occurrence and daily intake of OTA of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 223-227.

Green R., Hy M. (2002). La traçabilité: un instrument de la sécurité alimentaire. *Agroalimentaria*, 7: 19-28.

Griffiths B.S., Ritz K., Bardgett R D., Cook R., Ekelund F., Sørensen S.J., Baath E., Bloem J., De Ruiter P.C., Dolfen J., Nicolardot, B. (2000). Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*, 90: 279-294.

Grosso F., Saïd S., Mabrouk I., Fremy JM., Castegnaro M., Jemmali M. et Dragacci S. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 1130-1140.

GS1 Belgium, Luxembourg (2006). Specification GS1 pour l'identification et la traçabilité des fruits, légumes et pommes. <http://www.gs1belu.org/files/Tracering-AGF%20FR.pdf>

Guého E., Kurtzman C.P., Peterson S.W. (1990). Phylogenetic Relationships among Species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from Partial rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40** : 60-65.

Guiraud J.P. (1998). Microbiologie Alimentaire. Pp. 321–333. Paris: Dunod Ed.

Guyot G. (1993). Torréfaction: mécanismes, transformations physiques et chimiques. In *Journées du Cafe, CIRAD-CP, Montpellier* du 03 au 05 juin.

Hancock J. M., Tautz D., Dover G. A. (1988). Evolution of the Secondary Structures and Compensatory Mutations of the Ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol. Molecular Biology and Evolution*, **5**: 393-414.

Harris J.P., Mantle P.G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, **58**: 709 – 716.

Hassouna N., Michot B., BacheHerie J. P. (1984). The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, **12**: 3563-3583.

Hawksworth D.L., Mueller G.M. (2005). Fungal communities: their diversity and distribution. In: Dighton J, Oudemans P, White J (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 3rd edn. Marcel Dekker, New York, pp 27–37.

Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, **1**: 67 – 72.

Heilman W. (2001). Technology II: Decaffeination of Coffee, in Coffee Recent Developments. Clarke R. J. & Vitzthum O. G., Editors, Blackwell Science Ltd.: London GB. pp. 108-124.

Heilman W., Rehfeldt A.G., Rotzoll F. (1999). Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research Technology*, **209**: 297-300.

Herrera C.M., Pozo M.I. (2010). Nectar yeasts warm the flowers of a winterblooming plant. *Proceedings of the Royal Society*, 1-8. doi: 10.1098/rspb. 2009.2252 <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2010/02/05/rspb.2009.2252.full.pdf+html>

Hesham A.E.L., Khan S., Liu X.C., Zhang Y., Wang Z., Yang, M. (2006). Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurryreactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast*, **23**: 879–887.

Heyndrickx M., Vauterin L., Vandamme P., Kersters K., De Vos P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, **26**: 247-259.

Hobbs J.E. (2004). "Traceability in the Canadian Red Meat Sector: Do Consumers Care?" *Agribusiness*, **20**: 397-415.

Höhler, D. (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **37**: 2–12.

Hugge R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. Bergman H.L. (1992). *Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. LewisPublishers, Ann Arbor, MI.

Huss H.H. (1999). Quality and quality changes in fresh fish. FAO fisheries technical papers. M-47 ISBN 92-5-203507-9, Rome 348p.

Huxley R., Man Ying Lee C., Barzi F.A.I.S. (2009). Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus. *Archive International Medecin*, 169:2053-2063.

Hymery N., Sibril Y., Parent-Massin D. (2006.)In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells.*Toxicology*, **20**: 899-909.

IARC (International Agency Research of Cancer) (1993). Ochratoxin A. some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Lyon: Proceeding, *IARC Press*, 56: 489-521.

Iavicoli I., Brera C., Carelli G., Caputi R., Marinaccio A., Miraglia M. (2002). External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International Archive Occupationally Environment Health*, 75: 381-386.

Ibekwe A.M., Papernik S.K., Gan J., Yates S.R., Yang C.H., Crowley D.E. (2001). Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied andEnvironmental Microbiology*, 67: 3245-3257.

Illy A., Viani R. (1998). *Espresso Coffee*. Academic Press. San Diego, CA. Brazil p35.

Jiménez A.M., Lopez de Cerain A., González-penas E., Bello J. (1999). A high performance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. *Chromatographia*, 50: 457-469.

Johnston K. L. et Clifford, M.N.; Morgan, L.M. (2003). « Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine ». *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (4): 728–733.

Joosten H.M.L.J., Goetz J., Pittet A., Schellenberg M., Bucheli P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 39–44.

Jorgensen K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15: 550–554.

Jorgensen K., Jacobsen J.S. (2002). Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1184-1189.

Kaniou-Grigoriadou I., Eleftheriadou A., Mouratidou T., Katikou P. (2005). Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food control*, 16: 257-261.

Khot P.D., Ko D.L., Fredricks D.N. (2009). Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1559-1565.

Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. (2005). The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 207-214.

- Kowalchuk G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., Woldendorp, J.W. (1997).** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR- amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3176-3181.
- Kuiper-Goodman, T. (1996).** Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants*, 13: 535–557.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. (1989).** Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biometrics Biomedical and Environmental Sciences*, 2: 179–248.
- Kurtzman, C.P., Robnett C.J. (1998).** Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Laforgue R., Guérin L., Pernelle J. J., Monnet C., Dupont J., Bouix M. (2009).** Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1208-1218.
- Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. (2001).** Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *penicillium*. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 3630-3635.
- Le Nguyen DD, Ha H, Dijoux D. (2008).** Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR–DGGE: an application on Pangasius fish from Vietnam. *Food Control*, 19: 454–460.
- Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Vives-Rego J., Muyzer G., Bernard L., Guindulain T., Schäfer H., Stackebrandt E. (1999).** Changes in bacterial community

structure in seawater mesocosms differing in their nutrientstatus. *Aquatic Microbial Ecology*, 19: 255-267.

Le-Bars J. (1988). Toxinogénese en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes, dans Conservation et Stockage des grains et graines, et produits dérivés. *Multon J.L., Editor, Technique et Documentation Lavoisier* : Paris, France, pp. 376 – 391.

Leensing R. (2005). Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poisons d'aquaculture lors de leur import/export. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 183 p.

Leonard N., Bell Clinton R., Wetzel Alexandra N., Grand (1987). « Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques ». *Food Research International*, 29: 8.

Leong S.L., Hien L.T., An T.V., Trang N.T., Hocking A.D., Scott E.S. (2007b). Ochratoxin A-producing Aspergilli in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 301–306.

Leoni L. A.B., Soares L.M.V., Oliveira P.L.C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instand coffees. *Food Additives and Contaminants*, 17 (10): 867-870.

Levi C. (1980). Mycotoxins in coffee. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63: 1282-1285.

Levi C. P., Trenk H. L., Mohr H. K., (1974). Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal of Official Analytical Chemists*, 57: 866-870.

Li S., Marquardt, R.R., Frohlich A.A., Vitti, T.G., Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A an its metabolites in rats. *Toxicology and Applied pharmacology*, 145: 82-90.

Li X., Zhang H., Wu M., Zhang Y., Zhang C. (2008). Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 619-625.

Loftus R. (2005). Food Control and Legislation Farm to Fork Traceability through DNA Technology.<http://www.foodtech-international.com/papers/farmtofork.htm>.

Lombaert G.A., Pellaers, P., Neumann G., Kitchen D., Huzel V., Trelka R., Kotello S., Scott P.M. (2004). Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, 17: 61-69.

Lopez de Cerain., González-penas E., Jiménez A.M., Bello J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines.*Food Additives and Contaminants*, 19: 1058–1064.

Lopez M.M., Freitas G., Boiron P. (2000). Potential utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction endonuclease assay (REA) as typing systems for *Madurella mycetomatis*.*Current Microbiology*, 40 (1): 1 – 5.

López-Archilla A.I., Marín I., Amils R. (2001). Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microbial Ecology*, 41 : 20-35.

Maier H. G. (1987). Les acides du café. *Café Cacao Thé*, 31: 49-58. Balzer H. H., 2001, Acids in Coffee, in *Coffee Recent Developments*. Clarke R. J. & Vitzthum O. G., Editors, Blackwell Science Ltd.: London GB. pp. 18-32.

Maila, M. P., Randima, P., Cloete, T. E. (2006). Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil biology & biochemistry*, 38: 303-310.

Maiworé J. (2010). Etude de la diversité bactérienne des tilapias (*Oreochromis niloticus*) du Nord Cameroun : Application à la détermination de l'origine géographique. Thèse de Doctorat PhD. Université de Ngaoundéré, Cameroun. 181p.

Manolova Y., Manolov G. Parvanova L., Petkovabocharova T., Castegnaro M., Chernozemsky I.N. (1990). Induction of characteristic chromosomal-aberrations, particularly X-Trisomy, in cultured Human-lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic Nephropathy. *Mutation research*, 231: 143- 149.

Mantle P. G., Chow A. M. (2000). Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 105-109.

Mantle P. G. (2002). Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration Biodegradation*, 50: 143-146

Mantle P.G., McHugh, K.M. (1993). Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycological Research*, 97 : 205–212.

Marc Fortier, Charveriat C. (2001). The coffee market, a background study, Oxfam GB.
www.pouruncommerceéquitable.com

Markovic B. (1985). Néphropathie des Balkans et carcinomes à cellules transitionnelles. *Journal Urologie*, 91: 215-220.

Marshall M.N., Cocolin L., Mills D.A., VanderGheynst J.S. (2003). Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 934-948.

- Martins M.L., Martins H.M., Gimeno A. (2003).** Incidence of micro flora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants*, 20: 1127–1131.
- Masoud W., Kaltoft C.H. (2004).** The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 229 – 234.
- McCracken V.J., Simpson J.M., Mackie R.I., Gaskins H.R. (2001).** Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of themouse intestinal microbiota. *Journal of Nutrition*, 131: 1862–1870.
- Menchú J. M., Rolz C. (1973).** Coffee Fermentation Technology. *Café Cacao Thé*, 17: 53-61.
- Mendes L.C., Mendes H.C.d., Aparecida M., Silva A.P. d. (2001).** Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora* conillo) using acceptability test and rsm. *Food Quality and Preference*, 12: 153-162.
- Micco C., Grossi M., Miraglia M., Brera C. (1989).** A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Additives and Contaminants*, 6: 333-339.
- MINADER (Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural), 2008.** Rapport Trimestriel de juin DESA/MINADER, Cameroun, 30p.
- Miraglia M., Brera C. (2002).** Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7, 69-86. Publisher: SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf.

Mislivec P.B., Bruce V.R., Gibson R. (1983). Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *Journal of Food Protection*, 46: 969-973.

Möhlenhoff P., Müller L., Gorbushina A.A., Petersen K. (2001). Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters*, 195 : 169-173.

Molot B. (2003). Maîtrise des teneurs en OTA dans les vins : Quelles recommandations ? Editeur : France Nîme/ Rodilhan p5.

Morello L.G., Sartori D., Martinez A.L.O., Vieira M.L.C., Taniwaki M.H., Fungaro M.H.P. (2007). Detection and quantification of *Aspergillus westerdijikiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 270–276.

Morrin O., Haloun A., Treilhaud M., Sagan C., Boiron P. (1999). Systemic mycosis due *Pseudallescheria boydii* in a double transplant patient with a cystic fibrosis. Study of isolated strains with RAPD (random amplification of polymorphic DNA). *Journal de Mycologie Medicale*, 9 : 119 – 123.

Mueller G.M., Bills G.F. (2004). Introduction. In: Mueller G. M., Bills G. F, Foster M. S. (eds) Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. *Elsevier Academic Press*, San Diego, pp1-4.

Multon J.L., Poisson J., Cahagnier B., Hahn D., Barel M., Santos A. C. D. (1974). Evolution de Plusieurs Caractéristiques d'un Café Arabica au Cours d'un Stockage Expérimental Effectué à Cinq Humidités Relatives et Quatre Températures Différents. *Café Cacao Thé*, 18:121-132.

Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317–322.

Muyzer G., De Waal, E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.

Muyzer G., Hottenträger S., Teske A., Wawer C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L., Van Elsas, J. D., & De Bruijn, F. J. (Eds). *Molecular Microbiol Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-23.

Nakajima M., Tsubouchi H., Miyabe M., Ueno Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high- performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 9: 77–83.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983). In: *Fusarium Species An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, Philadelphia, PA.p. 193.

Nicolaisen M.H., Ramsing N.B. (2002). Denaturing gradientgel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 50: 189-203.

Nieguitsila A., Deville M., Jamal T., Halos L., Berthelemy M., Chermette R., Latouche S., Arné P., Guillot J. (2007). Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 86-95.

Nielsen D.S., Hønholt S., Tano-Debrah K., Jespersen L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22: 271–284.

Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen k.F., Frisvad J.C., Samson R.A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 197–202.

Ogier J.C., Son O., Grus A., Tailliez P., Delacroix-Buchet A. (2002). Identification of bacterial microflora in dairy products by temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3691-3701.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1990). Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria, 105 p.

Organization of United Nations (FAO) (2006). Reducing Ochratoxin A in Coffee. Available source: <http://www.coffee-ota.org>, February.

Otteneder H., Majerus P. (2001). Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Additives and Contaminants*, 18 : 431-435.

Ouguerram A. (1989). Contribution à l'étude des parois cellulaires de deux fruits industrielles: l'olive et le café. Ph D Thesis. Université de Paris VI. 180p

Park L., Boutrif E. (1999). Minimiser les risques associés aux mycotoxines, à l'aide du concept HACCP. In *Troisième Conférence Internationale Mixte. FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines*, Tunis, Tunisie. 3-6 mars pp. 1-12.

Pascale M., Solfrizzo M., De Girolamo A., Visconti A. (2000). Determination of mycotoxins in foods and beverages by means of immunoaffinity columns and highperformance liquid chromatography. *Bulletin Institutional Compr. Agricultural Science of kinki University*, 8: 39-50.

Peakall D.B., Walker C.H., Migula P. (1999). Biomarkers: Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe, p 323. Kluwer Academic Publishers, London.

Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (2000). Efectos toxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletin de la Organizacion Mundial de la Salud, recopilacion dearticulos*, 2 : 80-92.

Petraco M. (2001). Technology IV: Beverage Preparation: Brewing Trends for the New Millennium, in *Coffee Recent Developments*. Clarke R. J. & Vitzthum O. G., Editors, Blackwell Science Ltd.: London GB. pp. 140-164.

Petzinger E., Weidenbach A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Porduction Science*, 76: 245-250.

Pfohl-Leszkowicz A., Castegnaro M. (1999). L'ochratoxine A, In : les Mycotoxines dans l'alimentation : évolution et gestion des risques. *Pfohl-Leszkowicz A., Editor, Lavoisier* : Paris, France, pp 249 – 277.

Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E. E., Dirheimer G. (1991). DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A, in *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Bartsch H., Editor, IARC Sci. Publ. No. 115: Lyon, France. pp. 245-253.

- Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N., Castegnaro M. (2002).** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 19 (3): 282-302.
- Pina C., Teixeira P., Leite P., Villa M., Belloch C., Brito L. (2005).** PCRfingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in carbonated orange juice production chain. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1107-1114.
- Pitt J.I. Hocking A.D. (1997).** Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London. 593 pp.
- Portetelle D., Haezebroeck V., Mortiaux F., Renaville R. (2000).** Traçabilité dans la filière animale. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 4 : 233-240.
- Puerta-Quintero G.I. (1999).** Influencia del Proceso de Beneficio en la Calidad del Café. *Cenicafé*, 50: 78-88.
- Raspor P. (2002).** *Handbook for Establishment and Conducting HACCP System*.XIV, p 598, Slovenski institut za kakovost in meroslovje: Biotehniška Fakulteta,Oddelek za živilstvo, Ljubljana.
- Raspor P. (2003).** Primary identifiers of food items using bio(logical) markers. In *Managing the complexities of traceability for quality, safety and profit: FoodTracE: conference proceedings*, p 5–7. European Commision Concerted, Action Project, Brussels.
- Raspor P. (2004).** Bio-markers as primary identifiers as needed for food safety and traceability of food items. In: *2nd Central European Congress on Food*, April 2004, Budapest, Hungary, p 1-11, CE Food Congress. Consumers, Nutrition, Safety, Technology.

Ringot D., Chango A., Scheneider YJ., Larondelle Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 18-46.

Romani S., Pinnavaia G.G., Dalla Rosa M. (2003). Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5168– 5171.

Romani S., Sacchetti G., López C.C., Pinnavia G.G., Rosa M.D. (2000). Screening on the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans of Different Origins and Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3616-3619.

Rosa C.A.R., Magnoli C.E., Fraga M.E., Dalcero A.M., Santana D.M.N. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21: 358-364.

Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomes, A., Weiss, J. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, 18: 33-39.

Roussos S., Aquíahuatl M.d.l.A., Trejo-Hernández M.d.R., Perraud I.G., Favela E., Ramakrishna R., Raimbault M., Viniegra-González G. (1995). Biotechnological management of coffee pulp - isolation screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42: 756-762.

Rouvier M. (2002). L'ochratoxine A: Nature, origine et toxicité. Thèse: 2002- TOU 3 – 4204.

”<http://oatao.univ-toulouse.fr/1054/1/celdran.1054.pdf>”

Sage L., Garon D., Seigle-Murandi F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 5764–5768.

- Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. (2004).** New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.
- Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken Frisvad J.C., Varga, J. (2007).** Diagnostic tools to identify black *aspergillii*. *Studies in mycology*, 59: 129-145.
- Samson, R.A. (1991).** Identification of food –borne Penicillium, Aspergillus and Fusarium species. In ACIAR proceedings No 36, Bangkok, Thailand, 23-26 April pp. 39-45.
- Sandhu G., Kline B.C., Stockman L., Roberts G.D. (1995).** Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2913-2919.
- Saracci R. (1997).** Comparing measurements of biomarkers with other measurements of exposure. In *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology*. Toniolo P, Boffe a P, Shuker DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N eds. IARC Scientific Publications No. 142, pp 303–312, Lyon.
- Sartori D., Furlaneto M.C., Martins M.K., Ferreira de Paula M.R., Pizzirani-Kleiner A.A., Taniwaki M.H., Fungaro M.H.P. (2006).** PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157: 350–354.
- SCF (1998).** Opinion of the Scientific Committee for Food on OTA expressed on 17 Sep 1998. http://www.europe.eu.in/contam/food/fs/sc/scf/out14_en.hlm.
- Schäfer H., Muyzer G. (2001).** Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, 30: 425-452.
- SCOOP TASK. (2002).** (Reports on tasks for scientific cooperation), Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the populatiotn of EU Member States. P.153

Scott P.M. (1994). Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins. *Phytopathology*, 2238: 261-507.

Scudamore K.A., Patel S. (2000). Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*, 17: 407-416.

Seifert K.A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9: 83-89.

Serra R., Braga A., Venancio A. (2005). Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*, 156: 515–521.

Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M. (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragment by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 232-236.

Silva C.F., Schwan R.F., Sousa-Diaz E., Wheals A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 251-260.

Silva C.F., Schwan R.F., Sousa-Diaz E., Wheals A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 251-260.

Silwar R., Lüllmann C. (1988). The determination of mono- and disaccharides in green arabica and robusta coffees using High Performance Liquid Chromatography. *Café Cacao Thé*, 32: 319-322.

Skaug M.A. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 16: 75–78.

Smit E., Leeflang P., Glandorf B., Van Elsas J.D., Wernars K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65: 2614–2621.

Soliman K.M. (2002). Incidence, Level, and Behavior of Aflatoxins during Coffee Bean Roasting and Decaffeination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25): 7477-7481.

Souza Monteiro D., Caswell J.A. (2004). The Economics of Implementing Traceability in Beef Supply Chains: Trends in Major Producing and Trading Countries. Paper presented at *NAREA Annual Meeting*, Halifax, Nova Scotia, Canada p86.

Staley J., Konopka A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganism in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39: 321-346.

Stander M.A., Bornscheuer U.T., Henke E., Steyn P.S. (2000a). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 5736-5739.

Steyn P.S. (1993). Ochratoxin A: its chemistry, conformation and biosynthesis. Edited by INSERM/John Libbey Eurotext London, 231: 51-58.

Suárez-Quiroz M.L. (2004). Etude des conditions de production d'ochratoxine A dans le café. Contrôle et prévention de sa formation. Thèse de l'Université de Montpellier II, p163.

- Suárez-Quiroz M.L., González-Rios O., Barel M., Guyot B., Schorr-Galindo S., Guiraud J.P. (2004).** Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in non-ripe coffee. *Food Microbiology*, 21: 629–634.
- Tangni E.K., Ponchaut S., Maudoux M., Rozenberg R., Larondelle Y. (2002).** Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1169-1179.
- Taniwaki M.H., Pitt J.I., Teixeira A.A., Iamanaka B.T. (2003).** The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2): 173-179.
- Taylor J.W., Geiser D.M., Burst A., Koufopanou V. (1999).** The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 126-130.
- Temmerman R., Scheirlincks I., Huys G., Swings J. (2003).** Culture independent analysis of probiotic products by DGGE. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 220-226.
- Teren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., Kevei F. (1996).** Immunochemical detection of Ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134 : 171-176.
- Trugo L.C., Maria C.A.B.D., Werneck C.C. (1991).** Simultaneous Determination of total Chlorogenic Acid and Caffeine in Coffee by High Performance Gel Filtration Chromatography. *Food Chemistry*, 42: 81-87.
- Urbano G.R., Taniwaki M.H., Leita M.F.d.F., Vicentini M.C. (2001).** Occurrence of Ochratoxin A-Producing Fungi in Raw Brazilian Coffee. *Journal of Food Protection*, 68 (8): 1226-1230.

- Vainio E.J., Hantula J. (2000).** Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104: 927-936.
- Valenta H. (1998).** Chromatographic methods for determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography*, 815: 75-92.
- Van Dam R.M., Hu F.B. (2005).** Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: *A systematic review and meta-analysis*. 295 (11): 1288-1299.
- Van der Stegen G.H.D. (2003).** Enhancement of coffee quality by mould prevention. *Food Control*, 14 (4): 245-249.
- Van Egmond H.P. (1999).** Worldwide regulation of ochratoxin A. Conference proceeding IARC Sci. Publ., 115: 331-336.
- Van Elsas J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. (2000).** Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 43: 133–151.
- Van Hannen, E. J., Mooij, W., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Laanbroek, H. J. (1999).** Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65: 2478–2484.
- Varga J., Kevei, F., Rinyu, F., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (1996).** Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4461-4464.
- Von Wintzingerode F., Göbel U.B., Stackebrandt E. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213-229.

Walter B.P., Heimann M., Matthews E. (2001). Modeling modern methane emission from natural wetlands. 1. *Model description*, 106, 34207-34219.

Ward D.M., Ferris M.J., Nold S.C., Bateson M.M. (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1353-1370.

Ward D.M., Weller R., Bateson M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345: 63-65.

White E. (1997). Effects of biomarker measurement error on epidemiological studies. In: *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology*. Toniolo P, Boffe a P, Shuler DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N, eds, pp 73–93, IARC Scientific Publications No. 142, Lyon.

WHO (World Health Organization) (1996). Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th Report of JECFA; WHO Technical Report series 859; WHO: Geneva, Switzerland.

Wilson I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3741-3751.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221–271.

Woolfe M.L., Primrose S. (2004). Food Forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22: 222–226.

Xiao H., Madhyastha S., Marquardt R.R., Li, S., Vodela J.K., Frohlich A.A., Kemppainen W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137: 182-192.

Yi-Fang Chu, Yumin Chen, Richard M., Black Peter H., Brown B.J., Lyle RuiHai Liu, Boxin Ou (2011). «Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF-kB inhibition, and stimulation of glucose uptake». *Food chemistry*, 124: 914-920.

Zuckerland E. Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., & Vogel, H. J. (Eds). *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp 97-166.

Sites Web consultés :

<http://www.hyperdictionary.com/medical/biomarkers> (Consulté le 12 Janvier 2012 ; date de dernière mise à jour: septembre 2011).

http://www.afrique.planete.com/cameroun/carte_cameroun.htm (Consulté le 06 Juillet 2011 ; date de dernière mise à jour mise à jour: Avril 2010).

ANNEXES

ANNEXE 1

PROCEDURE DE DOSAGE DE L'OTA DANS LE CAFE VERT PAR HPLC

(Référence : laboratoire d'analyses des mycotoxines des produits tropicaux du CIRAD :
version 01)

1- PRINCIPE

OTA est extraite du café vert par un mélange de méthanol et de bicarbonate de sodium. L'extrait est purifié sur une colonne d'immunoaffinité. OTA est séparée et identifiée par HPLC et quantifiée par spectrofluorescence.

Précaution

OTA est néphrotoxique, toxique pour le foie et présente des propriétés immunodépresseurs. Les gants et les lunettes doivent être portés lors des expérimentations.

2- REACTIFS

Seuls les réactifs de qualité analytique peuvent être utilisés lors de ce dosage

2-1- Les solutions d'étalonnage sont préparées à partir d'une solution étalon à 200 ng/ml (CF protocole 4.1).

2-2- Méthanol (qualité HPLC).

2-3- Bicarbonate de sodium (qualité analytique)

2-4- Solution à 3% de bicarbonate de sodium.

Dissoudre 30g de bicarbonate de sodium dans 1L d'eau distillée dans une fiole jaugée.

2-5- Solvant d'extraction.

Préparer le mélange (50/50) à partir du méthanol (2.2) et de la solution à 3% de bicarbonate de sodium (2.4)

2-6- Tampon phosphate (PBS).

2-7- Acétonitrile (qualité HPLC).

2-8- Acide acétique glacial. (Qualité analytique).

2-9- Réactif d'élution pour la colonne d'immunoaffinité.

Méthanol (2.2).

2-10- Phase mobile HPLC.

Préparer le mélange eau distillée 51 %, acétonitrile 48 % (2.7) et acide acétique glacial 1% (2.8).

2-11- Solution de dilution pour les standards. (Méthanol+eau, 3+7)

Préparer le mélange méthanol (2.2) 30 % et eau distillée 70 %.

3- PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

3-1- Extraction.

Peser 10g de café vert moulu dans une fiole conique de 500mL. Ajouter 100 mL du d'extraction (méthanol+solution de bicarbonate à 3%, 50+50, (2.5)) ; boucher la fiole et agiter doucement pendant 30minutes. Filtrer l'extrait sur celite sous vide et récupérer environ 25 mL de l'extrait filtré.

3-2- Purification sur colonne d'immunoaffinité

Diluer 10 mL de l'extrait filtré avec 30 mL de tampon PBS (2.6). Mettre en place la colonne d'immunoaffinité sur l'appareil à vide et le réservoir sur la colonne d'immunoaffinité avec 10 mL de PBS (2.6). Ajouter l'extrait dilué dans le réservoir et régler le débit à 2 mL/min maxi sur la colonne. Rincer par 2 fois avec 10 mL de PBS. Enlever le réservoir et placer un flacon silanisé de réception. Eluer la colonne avec (2+1)* mL de méthanol (2.2). Faire remonter le solvant par aspiration avec une seringue lors de l'élution, évaporer à sec (70°C) les 3 mL sous courant d'azote, puis reprendre dans 1 mL de phase mobile.

** Eluer la colonne avec 2 ml de méthanol une première fois, puis ajouter 1 ml. Recueillir les éluats dans le même flacon. Purger en final la colonne avec de l'air pour récupérer les dernières gouttes de méthanol.*

4- DETERMINATION PAR HPLC

4-1- Courbe d'étalonnage.

Elle est préparée à partir de solutions témoins de concentration connue. Les solutions témoins sont préparées à partir d'une solution à 200 ng/mL. Cette dernière solution est préparée à partir d'une solution commerciale avec une dilution adaptée par le mélange (méthanol+eau, 3+7).

Solutions étalons ST :

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5
µL méthanol+eau (3+7, v+v)	9987.5	9975	9950	9875	9750
µL 200 ng/mL OTA	12.5	25	50	125	250
Conc. OTA ng/mL	0.25	0.50	1.0	2.5	5.0

La courbe d'étalonnage doit être refaite lorsque les conditions chromatographiques changent (solvant d'élution, colonne etc).

4-2- Conditions opératoires.

4-2-1 Boucle d'injection de 100 µl.

4-2-2 Débit isocratique de 1 ml/min. Solvant d'élution : mélange eau distillée 51 %, acétonitrile 48 % (2.10) et acide acétique glacial 1% (2.11).

4-2-3 Colonne HPLC phase inverse C18, ODS de 1 à 5 µm avec précolonne, thermostatée à 35°C. Pression : de l'ordre de 95 –105 Bar.

4-2-4 Détecteur spectrofluorimètre.

λ excitation = 333 nm

λ émission = 460 nm

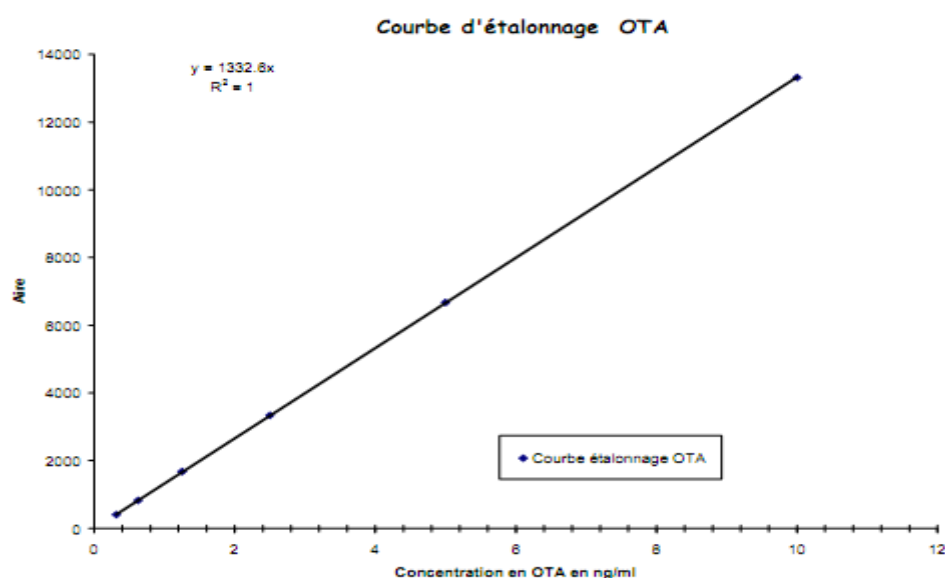
4-2-5 Intégrateur.

4-2-6 OTA : temps de rétention environ 12.5 – 13.5 min.

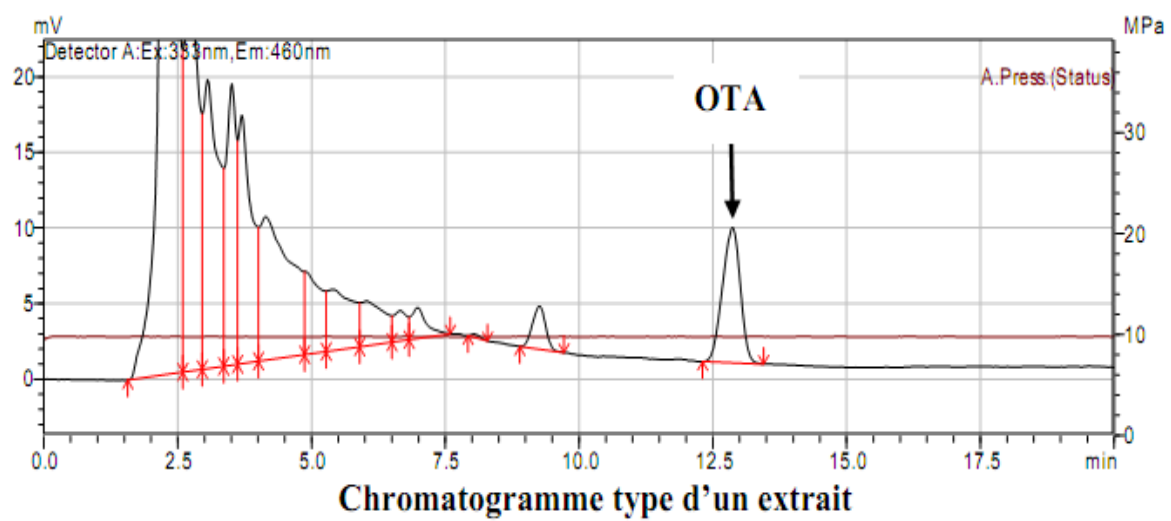
4-3- Résultats.

Les résultats sont calculés par rapport à la droite d'étalonnage et exprimés en µg/kg avec une décimale. Tenir compte des dilutions possibles.

COURBE D'ÉTALONNAGE TYPE



CHROMATOGRAMME TYPE



ANNEXE 2

PREPARATION DES REACTIFS POUR L'EXTRACTION D'ADN

Tampon Tris-EDTA (TE) à pH 8.0

Le tampon Tris-HCl permet de maintenir le pH nécessaire à l'activité des enzymes de lyse cellulaire et l'EDTA est un chélateur des ions nécessaire à l'activité des DNases bactériennes. Il est composé des solutions suivantes : 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (Promega, France) et 1,0 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France). Ce tampon est stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 50 X à pH 8,3 (Eppendorf, Allemagne)

Il est composé des solutions suivantes : 2M Tris-Acétate pH 8,3 et 0,05 M EDTA pH 8,3. Le tampon est dilué avec de l'eau distillée 50 fois avant usage.

Solution de lysozyme 25 mg/mL

25 mg de Lysozyme (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, Allemagne) et conserver à -20°C.

Solution de protéinase K 20 mg/mL

20 mg de Protéinase K (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, France) et conserver à -20°C.

Solution de SDS (Dodecyl sulfate de sodium) 20%

20 g de Dodecyl sulfate de sodium (Fluka, Allemagne) sont solubilisés dans 100 mL d'eau stérile (qsp).

Solution de NaCl 3M

175,32 g (3M) de NaCl (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1 L d'eau distillée (qsp). La solution finale est autoclavée à 121°C, 15 min.

Solution de MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2%

2 g de MATAB (Fluka, Allemagne) solubilisés dans 100 mL d'une solution de NaCl 3M. Mélange de Phénol/ Chloroforme/ Alcool isoamylique.

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Phénol (Fluka, Allemagne) 25mL/Chloroforme (Carlo Erba, France) 24mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1mL.

Mélange Chloroforme/ Alcool isoamylique

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Chloroforme (Carlo Erba, France) 24 mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1 mL.

Solution d'acétate de sodium 3M, pH 5,2

246,09 g (3M) de CH₃COONa (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1L d'eau distillée ajustée à pH 5,2 par de l'acide acétique. La solution est autoclavée à 121°C, 15 min.

Eau peptonnée tamponnée (bioMérieux, France)

Bouillon utilisé pour récupérer des flores microbiennes totales de fruit afin de réaliser une extraction d'ADN.

Préparation : Verser 25,5 g de milieu déshydraté dans 1 L d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 20 min à 121°C à l'autoclave.

Composants g	g/L
Peptone de caséine et de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5
Di-sodium hydrogénophosphate	9
Potassium di-hydrogénophosphate	1,5
pH 7,0	

ANNEXE 3

Protocole pour la purification de l'ADN

a. A partir d'un gel de DGGE

1. Exciser la bande d'ADN à partir du gel de DGGE et transférer dans un microtube Eppendorf.
2. Ajouter 100µL du tampon TE au fragment du gel. Incuber pendant la nuit à 4°C (élution passive). Transférer 100µL de la phase aqueuse dans un nouveau microtube Eppendorf.

A partir de cette étape:

3. Ajouter 1mL de résine. Vortexer pendant 20 sec pour bien mélanger.
4. Pour chaque échantillon, préparer une mini colonne Wizard. Enlever et séparer le piston à part de la seringue. Relier la seringue à la partie Luer-Lok de chaque mini colonne.
5. Pipeter le mélange résine/ADN dans la seringue. Insérer le piston lentement, et pousser doucement le produit à travers la colonne.
6. Détacher la seringue de la mini colonne et enlever le piston de la seringue. Rattacher la seringue à la mini colonne. Pipeter 2 mL d'isopropanol 80% dans la seringue.
7. Insérer le piston et pousser doucement à travers la colonne.
8. Enlever la seringue et transférer la colonne sur un microtube de 1,5 mL. Centrifuger la colonne à 10.000 g pendant 2 min.
9. Transférer la colonne sur un microtube Eppendorf neuf.
10. Ajouter 40 µL d'eau stérile et attendre 15 min. Centrifuger le microtube à 10000 g pendant 20 sec.
11. Repasser les 40 µL dans la colonne. Attendre 1 min et centrifuger à 10 000 g pendant 20 sec.
12. Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C.

ANNEXE 4

Résultat de l'analyse des variances

Année	1	2711.3	2711.3	10.8840	0.001855*
Période de collecte	2	142,1	71,1	0.2853	0,753074
Site	4	2248.3	562.1	2.2563	0,077127
Traitement	1	3007,8	3007,8	12,0742	0,001110 **
Stade de prélèvement	2	6033,1	3016,5	12,1093	5,733e-05 ***
Pourcentage de contamination en <i>A.niger</i>	1	418.1	418.1	1.6783	0.201483
Pourcentage de contamination en <i>A.Carbonarius</i>	1	6625,3	6625,3	26,5962	4,935e-06 ***
Pourcentage de contamination en <i>A.ochraceus</i>	1	585,1	585,1	2,3488	0,132087
Teneur en OTA	1	6,3	6,3	0,0253	0,874263
Residus	47	11708,1	249,1		

Codes significatifs: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1